

Zum Thema der Darstellung und
Trennung von Gyno- und Androspermien
bei Haussäugetieren:
Literaturstudie und Versuche zur
Unterscheidung von X- und Y- Spermien
durch Fluoreszenzmikroskopie

Bernd Junginger

*Guss
Münden
1905*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554825_0078

AUS DEM INSTITUT
FÜR TIERANATOMIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Tieranatomie II
insbesondere Allgemeine Anatomie,
Histologie und Embryologie
Vorstand: Prof. Dr. Fred Sinowatz

angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. I. Rüsse

Zum Thema der Darstellung und Trennung von Gyno- und
Andropermien bei Haussäugetieren:
Literaturstudie und Versuche zur Unterscheidung von
X - und Y - Spermien durch Fluoreszenzmikroskopie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Bernd Junginger
aus
Kirchheim unter Teck

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. I. Rüsse
Korreferent: Priv.Do. Dr. Dr. habil. R. Stolla

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

MEINEN ELTERN

UND MEINER SCHWESTER

IN DANKBARKEIT GEWIDMET.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	1
2. Literatur	
2.1. Geschichtliches	3
2.2. Mikroskopische Techniken	
2.2.1. Phasenkontrastmikroskopie	10
2.2.2. Fluoreszenzmikroskopie	
2.2.2.1. " F - body - Test "	17
2.2.2.2. " B - body - Test "	25
2.2.3. Elektronenmikroskopie	27
2.3. Photometrie	
2.3.1. Mikrospektrophotometrische Bestimmung des Feulgen-DNA-Komplexes	28
2.3.2. Ultraviolett-mikrospektrophotometrische Bestimmung der DNA	30
2.3.3. DNA - Gehaltsmessungen mit dem Elektronenmikroskop	32
2.4. Galvanische Verfahren	
2.4.1. Elektrophorese	33
2.4.2. Convection Counter Streaming Galvanization Technique	41
2.5. Zentrifugations- und Sedimentationsverfahren	
2.5.1. Zentrifugation	43

	<u>Seite</u>
2.5.2. Dichtegradientenzentrifugation	44
2.5.3. Sedimentationsdichtegradienten- zentrifugation	48
2.5.4. Sedimentation	50
2.5.5. Dichtegradientensedimentation	52
2.5.6. Convection Counter Streaming (Sedimentation) Galvanization Technique (CCSGT)	55
2.6. Progressive Motilität in Abhängigkeit von pH und Medium	63
2.7. Filtrationsverfahren	
2.7.1. Ionenaustauscherchromatographie	67
2.7.2. Millipore - Filtration	69
2.7.3. Gelfiltration	71
2.8. Enzymatische Verfahren	74
2.9. H - Y - Antigen	
2.9.1. Allgemeines	76
2.9.2. Darstellung und Nachweis	78
2.9.3. Ist eine Genexpression des haploiden Genoms in der post- meiotischen Phase der Spermato- genese existent?	79
3. Eigene Untersuchungen	
3.1. Material und Methodik	82
3.1.1. Gewinnung der Nebenhodenspermien	82

	<u>Seite</u>
3.1.2. Frischspermagewinnung	83
3.1.3. Fluoreszenzfarbstoffe	84
3.1.4. Dithiothreitol (DT), Dithioerythritol (DE)	84
3.1.5. Papaya - Protease (PP)	85
3.1.6. "F - body - Test"	
3.1.6.1. Klassische Methode	85
3.1.6.2. Modifikation nach U.C. HEDGE (1979)	86
3.1.6.3. Eigene Modifikation	87
3.1.7. "B - body - Test"	
3.1.7.1. Klassische Methode	89
3.1.7.2. Eigene Modifikation	90
3.1.8. Fluoreszenzmikroskopie	90
 4. Ergebnisse	
4.1. "F - body - Test"	
4.1.1. Klassische Methode	92
4.1.2. Modifikation nach U.C. HEDGE (1979)	96
4.1.3. Eigene Modifikation	100
4.2. "B - body - Test"	
4.2.1. Klassische Methode	101
4.2.2. Eigene Modifikation	105
 5. Diskussion	106

	<u>Seite</u>
6. Zusammenfassung	115
7. Summary	117
8. Anhang: Abbildungen	119
9. Literaturverzeichnis	132
10. Lebenslauf	167

1. Einleitung

In den letzten Jahren ist nach großen Erfolgen beim Embryotransfer und der Möglichkeit, das Geschlecht der Embryonen im Vielzellstadium bestimmen zu können, ohne den Keimling dabei zu schädigen, die Samenzelle beim Säuger als Träger der Geschlechtschromosomen wieder in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses gerückt.

Der Wunsch, das Geschlecht der Nachkommenschaft zu beeinflussen, ist uralt. Diesbezügliche Bemühungen wurden zuerst von Seiten der Humamedizin, aber auch der Tiermedizin angestrebt. Spermatozoen wurden anhand ihrer Morphologie photometrisch oder mikroskopisch in Gyno- und Androspermien separiert. Darauf aufbauend wurde mit Hilfe verschiedener Verfahren versucht, unter Berücksichtigung von speziellen physikalischen, physiologischen sowie immunologischen Eigenschaften der Samenzellen X- und Y-Spermienfraktionen zu isolieren, um zum einen dem Wunsch mancher Eltern nach einer Geschlechtsvorbestimmung bei ihren Kindern nachzukommen und andererseits zum Fortschritt in der Tierzucht beizutragen.

Inzwischen ist die Differenzierung von männlich und

weiblich determinierenden Spermien des Menschen fluoreszenzmikroskopisch möglich und hinreichend nachgewiesen.

Auch die Fraktionierung von Samenproben des Menschen ist bis zu einem Prozentsatz von über 80 mit verschiedenen Verfahren gelungen.

In der Tiermedizin wurden ebenso Trennversuche unternommen. Da es jedoch lange Zeit nicht gelungen war, Haussäugetierspermien mikroskopisch zu differenzieren, mußten Feldversuche mittels künstlicher Besamung durchgeführt werden. Die Erfolge waren unterschiedlich und nicht überzeugend.

Erst B.C. BHATTACHARYA beschrieb im Jahre 1976, als bisher einziger, das Gelingen einer fluoreszenzmikroskopischen Differenzierungsmethode.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf der Basis einer diese Thematik umfassend darstellenden Literaturarbeit die bekannten fluoreszenzmikroskopischen Differenzierungsmethoden bei Haussäugetieren zu prüfen und daran anschließend mit einem geeignet erscheinenden Trennverfahren zu versuchen, aus Samenproben verschiedener Haussäugetiere X- und Y-Spermienpopulationen zu isolieren.

2. Literatur

2.1. Geschichtliches

Schon vor tausenden von Jahren haben Menschen versucht, das Geschlecht ihrer Nachkommen vorherzusagen - und Einfluß darauf zu nehmen.

Das erste uns bekannte Dokument, welches dieses Thema zum Inhalt hat, ist ein chinesisches, ungefähr 4000 Jahre altes Manuskript. Auch in einem ägyptischen Papyrus aus dem Jahre 2200 vor Christus kann man lesen, daß schwangere Frauen mit grünlicher Gesichtsfarbe einem Sohn das Leben schenken werden.

Sogar Aristoteles, ebenso wie Talmud waren der Meinung, daß das Ausrichten des Hochzeitsbettes in Nord-Süd-Richtung die Empfängnis eines Stammhalters begünstige. (Diese Vorstellung geht auf Schäfer zurück, die davon berichteten, daß, wenn Mutterschafe während der Konzeption gen Norden blicken, viele von ihnen männliche Nachkommen gebären würden.)

Unzählige weitere ähnliche Geschichten, Märchen - ja, wenn man so will, Hypothesen eigener Erkenntnisse - wurden im Laufe der Zeitgeschichte erzählt und erzählt man sich vielleicht heute noch.

Aber gerade diese fantastischen Gedanken und Fantasie-

bilder gaben Naturwissenschaftlern immer wieder die Impulse, sich diesem Thema anzunehmen und sich ernsthaft damit zu beschäftigen.

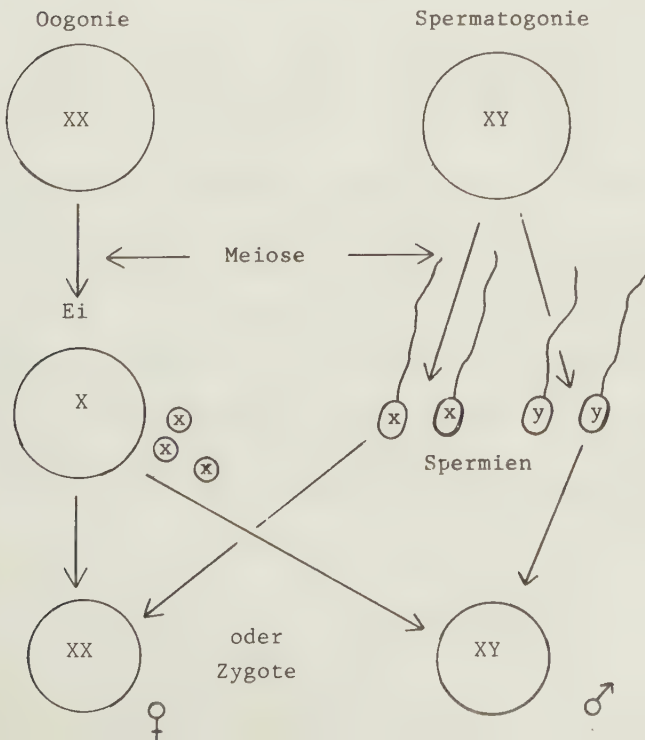
In vielen Gesellschaften war und ist ein männlicher Erbe, der somit den Familiennamen weiterführen konnte, ein wirtschaftliches und soziales Gut. Heute jedoch könnte die Menschheit vor den Gefahren geschlechtsbedingter Erbkrankheiten, wie der Hämophilie oder der Farbenblindheit, bewahrt werden, wenn eine praekonzeptionelle Geschlechtsbestimmung sicher und einfach durchgeführt werden könnte. Darüberhinaus wäre es für die Tierzüchter von großem und unschätzbarem Wert, wenn ihnen diese Möglichkeit für die Leistungszucht in die Hand gegeben wäre.

Im engeren Sinne beginnt die wissenschaftliche Geschichte dieser Thematik mit der Entdeckung der Mechanismen, welche das Geschlecht festlegen. Wie Schüler heute schon in der Schule lernen, gibt es unter den Chromosomenpaaren in Säugetierzellen ein spezielles Paar, das sich in männlichen und weiblichen Individuen unterscheidet. In weiblichen Zellen besteht es aus zwei identischen Anteilen - den sogenannten X - Chromosomen. In männlichen Zellen besteht das Paar aus einem X - und einem Y - Chromosom. Auf dem Wege der Spermato- und Oogenese werden nur in der Meiosephase die Chromosomenpaare gespalten, so daß je-

de reife Eizelle und jedes reife Spermium nur ein Geschlechtschromosom und insgesamt einen halben Chromosomensatz (n) besitzt. So besitzen alle weiblichen, haploiden Eizellen ein X - Chromosom, wohingegen Spermien als männliche, haploide Säugergeschlechtszellen entweder das X - oder aber das Y - Chromosom besitzen, und zwar verständlicherweise in einem anteilsmäßig gleichen Verhältnis (Abb. I).

Letztendlich steht also das Geschlecht eines Säugers in unmittelbarem Zusammenhang mit dem bei der Konzeption die Eizelle befruchtenden Spermatozootyp (X oder Y). Demzufolge kann innerhalb einer Population ein Geschlechtsverhältnis von 50 : 50 angenommen werden (Abb. I).

Abb. I



Daraus ergaben sich zwei für die Geschlechtsregulierung entscheidende Schlußfolgerungen:

1. Eine willkürliche Beeinflussung des Geschlechts ist nur vor oder während der Vereinigung der Keimzellen möglich, da das Geschlecht im Augenblick der Befruchtung festgelegt wird.
2. Die Hoffnung vieler Wissenschaftler, daß sich Spermien nicht nur in ihren Geschlechtschromosomen, sondern darüberhinaus auch in anderen Merkmalen und Eigenschaften unterscheiden könnten - ja sogar müßten.

So wurden viele und verschiedenste physikalische und chemische Methoden entwickelt, um Andro- und Gynospermien unterscheiden und trennen zu können.

Lange Zeit glaubte man, mit Hilfe bestimmter Umweltfaktoren auf die Geschlechtsentwicklung einwirken zu können.

So wurde etwa die Auffassung, daß die Art der Mondphase zur Zeit der Konzeption das Geschlecht der Nachkommen beeinflusse, erst relativ spät widerlegt.

Widerspruchsvolle Ergebnisse erbrachten Untersuchungen über den Einfluß des Decktermins, des Alters und Ernährungszustandes des Vattertieres oder die Verfütterung verschiedener chemischer Substanzen wie Coffein, Alkohol und Yohimbin an die Elterntiere.

Andere Autoren versuchten durch Vorbehandlungen der Muttertiere mit Sexualhormonen das Geschlechtsverhältnis der Nachkommen zu verändern.

An allerdings nicht sehr umfangreichem Material konnte durch Verabreichung von Follikelhormonen an weibliche Kaninchen, Mäuse und Hunde der Anteil an männlichen Nachkommen um 20 - 30 % erhöht werden. Testosteroninjektionen brachten dagegen keine derartig signifikanten Ergebnisse.

Auch Untersuchungen über den Einfluß von Spermatoxinen auf das Geschlechtsverhältnis bei Kaninchen und Ratten verliefen negativ.

Schließlich fragte man sich, ob X - und Y - Spermien sich nicht in ihrem physiologischen Verhalten unterscheiden.

Schon im Jahre 1930 glaubte man, durch Scheidenspülungen bei der Frau mit schwach alkalischen Lösungen, die vor dem Koitus durchgeführt wurden, ausschließlich Knaben geburten erzielen zu können.

Ähnliche Versuche an Kaninchen, Mäusen und Ratten bestätigten die am Menschen gewonnenen Ergebnisse jedoch nicht.

Umgekehrt konnte 1940 durch Scheidentouchierungen mit schwach sauren Lösungen eine erhöhte Anzahl weiblicher Nachkommen von Ratten erreicht werden.

Die Ursache hierfür suchte man in einer durch das al-

kalische bzw. saure Milieu bedingten Bevorzugung der männlich bzw. weiblich bestimmenden Samenzellen.

Ebenso naheliegend ist es, daß zunächst Trennungsversuche aufgrund morphologischer Unterschiede der beiden Spermientypen angestellt wurden.

Viele Wissenschaftler glaubten auch, morphologische Unterschiede verschiedenster Art festgestellt zu haben und berichteten über zweigipflige Verteilungskurven in der Kopflänge von Samenzellen des Menschen und einiger Säuger.

Auf der Grundlage dieses Spermindimorphismus wurden daraufhin zahlreiche Verfahren entwickelt, wie Sedimentations-, Zentrifugations- und Filtrationsverfahren.

Andere Untersuchungen befaßten sich mit dem Verhalten der Samenzellen im elektrischen Feld, wobei eine unterschiedliche Orientierung und Wanderung der Spermien zur Anode bzw. zur Kathode beobachtet wurde.

Während ein kleinerer Teil der Autoren von positiven Ergebnissen berichtete, lehnen die meisten Wissenschaftler die Spermielektrophorese als unzureichend, wenn nicht sogar als ungeeignet, weil wirkungslos, ab.

Auch die Entdeckung eines "spezifisch männlichen" Histo-

kompatibilitätsantigens, des H - Y - Antigens, welches nur in die Zellmembranen männlicher Organismen und, wie nachgewiesen werden konnte, auch in Spermienmembranen integriert ist, ermöglichte es nicht, Gyno- und Androspermien mit Hilfe modernster immunologischer Methoden trennen zu können.

Dennoch ist heute eine partielle Trennung von X - und Y - Spermien prinzipiell möglich.

Einer kompletten Trennung jedoch unter Verwendung der heute bekannten Methoden steht vermutlich die große biologische Variationsbreite beider Spermienpopulationen innerhalb eines Ejakulates entgegen.

2.2. Mikroskopische Techniken

2.2.1. Phasenkontrastmikroskopie

Erstmals im Jahre 1960 (a) berichtete SHETTLES über Beobachtungen bei der Untersuchung getrockneter, ungefärbter Spermienausstriche mit dem Phasenkontrastmikroskop, die eine optische Differenzierung menschlicher Spermien ermöglichen könnten.

In Ausstrichen stellten sich ihm zwei deutlich voneinander verschiedene Spermienpopulationen dar, wobei kein Zwischentyp auftrat.

Dabei handelte es sich um "schmalköpfige" Spermien mit einer wie er sich ausdrückte zentral gelegenen, runden Masse und "großköpfige" Spermien, die eine längsovale, zentral gelegene Masse aufwiesen (Abb. II und II₁).

Jeder Typ ließ ein bestimmtes, konstantes Muster in der Kernstruktur erkennen - zum einen ein zirkuläres bei den "schmalköpfigen", zum anderen ein elliptisches bei "großköpfigen" Spermien (Abb. IV).

Darüber hinaus konnte er Unterschiede sowohl in der Spermienkopfgroße als auch beim Verhältnis der beiden Typen je nach Spender feststellen.

Die wichtigste Erkenntnis für ihn und die Fachwelt aber

war die Annahme, daß die zentral gelegenen Chromosomen in der Kernmasse als X - (schmalköpfige Spermien) und Y - Chromosomen (großköpfige Spermien) identifiziert werden können und damit eine Möglichkeit zur Trennung von Andro- und Gynospermien gefunden wäre.

Noch im selben Monat nahm LORD ROTHSCCHILD zur Veröffentlichung von SHETTLES Stellung, wobei er darauf hinwies, daß schon viele Wissenschaftler versucht hatten, die Spermatozoentypen in Größe und Gestalt differenzieren zu können. Durch Messungen an Säugetierspermienköpfen hoffte man auf Parameter zu stoßen, die eine Unterscheidung ermöglichen könnten, was aber nicht gelungen war. LORD ROTHSCCHILD bemängelte an SHETTLES Untersuchungen, daß er kein Zahlenverhältnis der beiden Spermientypen angab und die Vergrößerungen der Abbildungen nicht stimmten, so daß ein Spermienkopf vom Menschen 30 μm und nicht wie bekannt 5 μm groß erschien. Er bezweifelte ferner, daß es sich bei den im Kern beobachteten Strukturen um Chromosomen handle. Er dachte an zerstörte Vakuolen oder Artefakte in vermutlich abnormalen Spermien, so daß er insgesamt keinen Hinweis dafür fand, daß SHETTLES morphologische Unterschiede zwischen X - und Y - Spermien gefunden hatte.

Abb. III

Abb. II

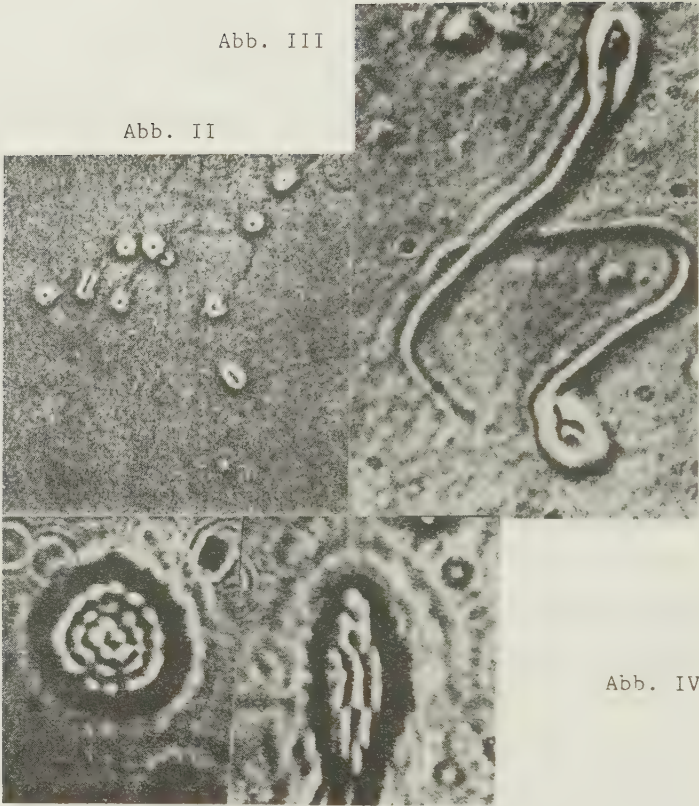


Abb. IV

Abb. II: Getrockneter, ungefärbter Spermienausstrich im Phasenkontrastmikroskop.

Abb. III: Lebende Spermien, die mit CO_2 immobilisiert wurden.

Abb. IV: Getrocknete, ungefärbte Spermienköpfe, welche das chromosomale Verteilungsmuster eines jeden Kopftyps aufweisen und zeigen.
Phasenkontrastaufnahme.

Abb. II-IV: aus SHETTLES:

Nature 186 : 648 - 649 (1960 a)

Schon wenige Monate später berichtete SHETTLES (1960 b) erneut über das von ihm erstmals entdeckte Phänomen. Er wies darauf hin, daß inzwischen einige hundert Wissenschaftler und namhafte Zytogenetiker die Methodik wiederholt und seine Beobachtungen bestätigt hätten.

In seinen weiterführenden Untersuchungen konnte er feststellen, daß die im Zentrum der jeweiligen Kopftypen gelegene Masse eindeutig Feulgen-positiv (siehe Kapitel Photometrie) reagiert, ebenso wie die anderen kompakten Chromatinmassen, die als Autosomen identifiziert wurden. In einigen der runden Kopftypen konnte er 23 einzelne Chromosomen zählen.

Bezugnehmend auf SHETTLES Veröffentlichungen (1960 a, b/1961 a-c) und der Kommentare dazu von ROTHSCILD (1960) und BISHOP (1960) nahm schließlich noch vor Ende des Jahres VAN DUIJN (1960, 1961) zum "Phänomen des Jahres 1960" Stellung.

Für ihn bestand nicht der geringste Zweifel, daß SHETTLES eine Anzahl optisch sichtbar gewordener Artefakte fehlinterpretiert hatte und stützt sich auf die Arbeiten von OETTLE (1950 a, b), der die Auswirkungen verschiedener Versuchsbedingungen auf das Phasenkontrastsystem einschließlich exakter Mes-

sungen der Phasenverschiebung bei getrockneten, unfixierten Spermienpräparaten und das Auftreten optisch sichtbarer Artefakte untersuchte.

Er wies darauf hin, daß Körper nie vollständig flach sind, so daß sphärische Partikel, z.B. ein Bild eines anderen Objekts, in einiger Entfernung ohne Verzeichnung erzeugen, während zylindrische oder asymmetrische Umrisse dagegen sehr leicht verzeichnete Bilder entstehen lassen. Darüberhinaus bemerkte VAN DUIJN (1960), daß im Gegensatz zum somatischen Interphasekern das Chromosomenmaterial im Spermienkern stark kondensiert ist und sich demzufolge in einem Zustand optischer Homogenität befindet. Obwohl er die Möglichkeit einer optischen Differenzierung a priori nicht ausschließt, wies er darauf hin, daß noch keine mikroskopische Technik, auch nicht die hochempfindlich arbeitende Interferenzmikroskopie, ähnlich strukturierte Details bei lebenden Spermien aufzeigen konnte.

Daher gab es für ihn keinen Grund einzusehen, daß gerade luftgetrocknete Präparate einen anderen Effekt zeigen sollten, und falls einfaches Trocknen das Auftrennen einzelner Chromosomen ermöglichen würde, so müßte dies auch mit dem Elektronenmikroskop nachweisbar sein, was aber auch mit den modernsten Techniken auf diesem Gebiet nicht gelungen ist (FRIEDLAENDER 1952, SCHULTZ und LARSON 1958).

SHETTLES (1962) stützte sich außerdem darauf, daß der positive Feulgen-Test im Zentrum der von ihm untersuchten Spermienköpfe seine Beobachtungen bestätigen würde.

Tatsächlich ließen sich die Untersuchungsergebnisse jedoch von VAN DUIJN (1960, 1961) nicht nachvollziehen. Alle Autoren, die lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt haben (LEUCHTENBERGER et al. 1953/1955/1956, VAN DUIJN 1957/1958), waren sich einig, daß im Spermienkern das Chromatinmaterial - im Widerspruch zu SHETTLES Feststellungen - in einer stark kondensierten Form vorliegt, die keine Strukturen erkennen läßt. Schließlich stellte VAN DUIJN aus zytologischer Sicht die Frage, warum die Chromosomen in den X - Spermien mehr oder weniger globulär, in Y - Spermien hingegen ellipsoid angeordnet sind, obgleich wir wissen, daß solche Strukturen weder bei Autosomen anderer Zellen, noch bei Eizellen gefunden wurden.

Nachdem nun auch SHETTLES Beobachtungen allgemein in Frage gestellt worden waren, maß die Fachwelt der Möglichkeit, Spermien morphologisch unter dem Mikroskop differenzieren zu können, keine Bedeutung mehr zu, bis 1964 LAIRD bei der morphologischen Analyse zweier von ihm elektrophoretisch (s. dort) getrennter Spermien-

fraktionen zwei unterschiedliche, morphologische Charakteristika bei den Spermien zu erkennen glaubte.

Nach Färbung der Spermienausstriche (von Bengal, Cary Hotchkiss, Cyanin-Färbung) konnte er unter dem Mikroskop in annähernd 50 % nicht getrennter Spermien das Auftreten eines "Kragens" in der Halsregion beobachten.

Nach elektrophoretischer Trennung konnte er diesen Kragen bei fast 100 % aller Spermien an der Kathode nachweisen und bei über 95 % der Spermien an der Anode nicht feststellen.

Das zweite Merkmal war die Spermienkopflänge, wobei seinen Beobachtungen zufolge "Anodenspermien" eine größere Kopflänge aufwiesen.

Aber schon er selbst schloß eine Fehlinterpretation nicht aus. Gründe hierfür sah er in

- a. einem zufälligen, nicht reproduzierbaren, zytochemischen Effekt der Färbung und
- b. einem Auslaugen beim Trennungsvorgang.

Nachdem es also nicht gelungen war, die Morphologie der Spermien als Unterscheidungsmerkmal heranzuziehen, wandte sich das Interesse zunehmend den physiologischen Kriterien zu.

2.2.2. Fluoreszenzmikroskopie

2.2.2.1. "F - body - Test"

Im Jahre 1969 veröffentlichte Lore ZECH eine Arbeit über die Untersuchung von Chromosomen in der Metaphase mit DNA-bindenden Fluorochromen und erwähnt unter anderem, daß es in einigen Fällen möglich ist mit einer Quinacrine Mustard - Färbung einzelne Chromosomen zu identifizieren, was mit herkömmlichen zytologischen Methoden schwer möglich war.

So konnte sie in Metaphasen menschlicher Blutzellkulturen das Y - Chromosom leicht an einer besonders hellen Fluoreszenz der distalen Hälfte seines langen Armes erkennen.

1970 versuchten dann BARLOW und VOSA, menschliche Spermien mit Fluorochromen zu färben. Sie verwendeten in Anlehnung an die Veröffentlichung von ZECH Quinacrine Mustard (QM) als Farbstoff und beobachteten eine gelbgrünliche Fluoreszenz in den Spermienköpfen. Im einzelnen erschien das basale Drittel der Köpfe (im Gegensatz zum Rest des Spermienkopfes) als dichte, fluoreszierende Masse wobei eine scharfe Grenze zwischen beiden Feldern besteht. Einige Spermien zeigten einen scharf umschriebenen, viel helleren, runden

Punkt, den sie "F - body" nannten.

In einem zweiten Versuch verwendeten sie Quinacridindihydrochlorid als Färbelösung, deren Fluoreszenz zwar nicht so schnell wie bei QM verblaßte, bei der aber bei Spermien desselben Spenders weniger "F - bodies" auftraten.

Die Häufigkeit des Auftretens der "F - bodies" in Spermien lag bei ungefähr 45 %. Dieses prozentuale Verhältnis, so glaubten sie, kann durch die Schwierigkeit, den "F - body" darzustellen, wenn er innerhalb des dichten Chromatins in der Spermienkopfbasis lokalisiert ist, verfälscht werden.

Gelegentlich fanden sie bei doppelschwänzigen, vermutlich diploiden Spermien auch zwei "F - bodies" und konnten feststellen, daß in über 60 % der "F - body - Spermien" der hell fluoreszierende Punkt an der Grenze zwischen stark und schwach fluoreszierendem Feld gelegen ist.

Daß der "F - body" mit dem Y - Chromosom gleichzusetzen ist, schlossen sie schließlich aus den Beobachtungen, daß das Y - Chromosom

1. in der mitotischen und meiotischen Metaphase
deutlich heller fluoresziert als andere Chromosomen,
2. in normalen XY - Interphasekernen nur ein stark

fluoreszierender Chromatinpunkt existent ist, während in XYY - Interphasekernen zwei Fluoreszenzpunkte nachzuweisen waren und

3. in weiblichen, diploiden (XX) Zellen diese charakteristischen Punkte fehlen.

Nachdem nun mit dieser Färbemethode das Y - Chromosom im Interphasekern von Lymphozyten, Fibroblasten und buccalen Mucosazellen nachgewiesen werden konnte, versuchten PEARSON et al. (1970 a, b) noch im selben Jahr, das Y - Chromosom in verschiedenen Phasen der Spermatogenese darzustellen.

In Spermatogonien zeigte das Y - Chromosom während der Metaphase nur in ungefähr 5 % der Zellen eine schwach positive Fluoreszenz. In allen anderen Stadien fluoreszierte das Y - Chromosom in charakteristischer Weise, wie dies auch in verschiedenen Stadien der Meiose deutlich zu erkennen ist. Bei Spermatiden und reifen Spermien war der "F - body" gewöhnlich unter dem Akrosom lokalisiert.

In den darauffolgenden Jahren versuchten zahlreiche Wissenschaftler, die der Fluorochromfärbung zugrundeliegenden chemischen Bindungsvorgänge und deren Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensität genauer zu erforschen. Wie diese chemischen Experimente (PEARSON

et al. 1971, MICHELSON et al. 1972, PACHMANN und RIGLER 1972, WEISBLUM und DE HASETH 1972/1973, SELANDER 1973 a - c) deutlich machten, haben verschiedene Nukleinsäurepolymeren verschiedenen Einfluß auf die Intensität der Fluoreszenz von Quinacrindihydrochlorid (QH) und Quinacrine Mustard (QM).

So stellte sich heraus, daß die Fluoreszenz der Farblösungen bei AT - (Adenin, Thymin) reicher DNA heller erscheint als bei GC - (Guanin, Cytosin) reicher DNA, was auch zytologische Experimente (ELLISON und BARR 1972) belegen konnten. Daraus folgte man zunächst eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom unterschiedlichen Basengehalt chromosomaler DNA.

Diese Hypothese erschien jedoch bald zu stark vereinfacht.

Zum einen reagierten spezielle Chromosomenabschnitte ganz offensichtlich konträr zu dieser Grundannahme. Denn obwohl die zentromeren Abschnitte von Chromosomen der Maus Satelliten-DNA enthalten, die besonders reich an AT ist, war die QM-Fluoreszenz hier deutlich schwächer als in den anderen Regionen (CORNEO und JONES 1968, JONES 1970, PARDUE und GALL 1970).

Eine ähnliche Diskrepanz zeigten die menschlichen Chromosomen 1, 9 und 16, deren zweite Einschnürung, die ebenfalls AT - reiche Satelliten-II-DNA (JONES und CORNEO 1971) enthält, auch eine deutlich schwä-

chere Fluoreszenz aufwies (CASPERSSON et al. 1968, 1970).

Zum anderen glaubte man an einen Einfluß chromosomaler Proteine auf das Fluoreszenzmuster der Acridinfarbstoffe (DE LA CHAPELLE et al. 1973, SELANDER 1973 a-c).

Aus diesen Gründen nahmen WEISBLUM und DE HASETH (1973) schließlich an, daß die Fluoreszenzintensität chromosomaler DNA *in situ* nicht allein vom Basengehalt, sondern im besonderen auch von Basenwiederholungen innerhalb der DNAs und den sie umgebenden Histonmolekülen abhängt.

Das typische Bandenmuster der Fluoreszenzqualität, verursacht durch die Kombination der Basengehaltvarianz und dem Typus der Basenwiederholungen, weist zum Beispiel auch das distale Ende des menschlichen Y - Chromosoms auf (DE LA CHAPELLE et al. 1973, SELANDER 1973 c). Seine DNA ist nicht außergewöhnlich reich an AT (sonst würde es schon bei relativ niedrigen Temperaturen denaturieren, so wie es andere AT-reiche Regionen tun), aber außerordentlich reich an Basensequenzwiederholungen (DE LA CHAPELLE et al. 1973), so daß man davon ausgehen muß, daß die helle QM - Fluoreszenz wahrscheinlich auf einer noch undefinierten Art der Basenwiederholungen beruht.

Darüberhinaus können Einflüsse durch Proteinzusammensetzung, -aggregation und -interaktionen auf die Bandenbildung der Acridinfarbstoffe nicht ausgeschlossen werden (CLARK und FELSENFELD 1971/1972, COMINGS et al. 1973, DE LA CHAPELLE 1973, SELANDER 1973 b, ROBERTS und GOODALL 1976).

Im engeren Sinne handelt es sich beim "F - body - Test", d.h. bei der Färbung mit Quinacrinfarbstoffen um die Alkylierung nukleophiler Gruppen der DNA - Moleküle. Genauer gesagt erfolgt die Alkylierung am N-7-Atom des Guaninringes (PEARSON 1972). Da das Y - Chromosom diese Reaktion im Vergleich zu den anderen Chromosomen verstärkt eingeht, läßt sich daraus auf einen weit höheren Puringehalt in der DNA-Helix schließen.

CAVALIERI und MELVIN (1971) zeigten, daß sich das Säureproton zuerst an die nukleophilste Position im DNA-Molekül anlagert. Im Falle der Quinacrinfarbstoffe sind diese reaktivsten Gruppen die N-7-Positionen.

Nachdem also die Darstellung der "F - bodies" in humanen Y - Spermatozoen nach BARLOW und VOSA (1970)

allgemein als zuverlässig anerkannt worden war, blieb trotzdem noch die Frage offen, warum der damit nachzuweisende Anteil an Y - Spermien pro Ausstrich 5 - 10 % unter dem zu erwartenden Wert von 50 % liegt.

Die Gründe hierfür sah man

1. im schnellen Verblässen der Fluoreszenz,
2. in einer gelegentlich mäßigen Aufnahme des Farbstoffes, welche das deutliche Auftreten des "F - body s" herabsetzt und
3. in einer eventuellen Unzugänglichkeit des Y - Chromosoms für die Quinacrinfarbstofflösung, wenn das Chromosom sich im innersten Teil des sehr kompakten Kernchromatins befindet.

Die einzige Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, sahen HEDGE et al. (1979) in einem Reagenz, welches das Kernchromatin dekontensiert und so die Chromosomen freilegt. Dazu verwendete BEDFORD (1973) Dithiothreitol mit und ohne SDS (sodium dodecyl sulphate). Auch in der Spermienimmunologie wird dieses Reagenz dazu benützt, Kernantigene freizulegen, welche auf andere Weise immunofluoreszenztechnisch nicht sichtbar gemacht werden können (KOLK et al. 1974, TUNG 1975).

HEDGE et al. (1979) testeten eine 4 mM Dithiothreitol-lösung (hergestellt mit Tris-HCl-Puffer; pH 9), wobei Spermiesuspensionen fertiler Männer zu gleichen Teilen in Dithiothreitol gelöst wurden. Als optimale Inkubationszeit für den gewünschten Grad der Dekondensation ergaben sich 20 Minuten (10 Minuten Ruheinkubation und 10 Minuten Zentrifugation bei 100 g). Es wurde kein Reagenz benutzt, um die Reaktion abubrechen.

Bei längerer Inkubation neigten die Spermien dazu, in eine gelatineartige Masse zu zerfallen. Die Behandlung menschlicher Spermien mit Dithiothreitol-lösung führte zum Quellen der Kerne und der ganzen Zelle.

Die Dekondensierung des Nukleochromatins an sich beruht auf einer Spaltung der Disulfid(-S-S-)brücken der Nukleoproteine (BEDFORD 1973).

Letztendlich konnten im Vergleich zu nichtbehandelten Proben in Ausstrichen behandelter Spermien ungefähr 3 % mehr "F - bodies" festgestellt werden.

Darüber hinaus ergab sich eine deutliche Verbesserung der Fluoreszenzintensität, die nicht zuletzt auch auf eine erhöhte Farbstoffaufnahme zurückzuführen ist.

Nachdem aber der Grad der erreichten Dekondensation bei mit Dithiothreitol behandelten Spermien nach HEDGE et al.

(1979) variiert und Verunreinigungen der Samenflüssigkeit unter anderen noch unbekannten Faktoren einen Einfluß darauf haben, lassen nur Experimente mit gewaschenen Spermien relativierbare Ergebnisse zu. Insgesamt aber empfiehlt sich diese Methode, um den Prozentsatz der Y - Spermien besser auswerten zu können.

Der "F - body - Test" nach BARLOW und VOSA (1970) gilt derzeit als die anerkannteste Labormethode, mit der die Effizienz der Verfahren zur Trennung von menschlichen X - und Y - Spermien beurteilt werden kann. (DIASIO 1971, ROHDE 1972/1973/1975 a,b, ERICSSON et al. 1973, QUINLIVAN et al. 1974/1982, SHISHITO et al. 1974/1975, ROSS 1975, SCHILLING und THORMÄHLEN 1975/1977, STEENO et al. 1975, DOWNING et al. 1976, PORSTMANN 1976, ERICSSON 1977, GLASS 1977, HEDGE et al. 1977, PORSTMANN et al. 1978, SCHILLING et al. 1978, ADIMOELJA et al. 1979, DMOWSKI 1979 a, b, PORSTMANN 1979, PORSTMANN und SCHMECHTA 1979, DANIELL et al. 1982).

2.2.2.2. "B - body - Test"

Nachdem nun das Y - Spermium des Menschen und anderen Primaten durch die Färbung mit Quinacrinhydrochlorid sowie Quinacrine Mustard leicht und allgemein anerkannt identifiziert werden konnte, entwickelten BHATTACHARYA

et al. (1976) eine Fluoreszenzfärbetechnik - den "B - body - Test" -, mit deren Hilfe auch Y - Spermien von Rind und Pferd darzustellen sein sollten.

Neben den Untersuchungen von HANSEN (1971) und SUMNER et al. (1971/1976), die vergeblich versuchten, "F - bodies" darzustellen, ist die obengenannte Veröffentlichung von BHATTACHARYA eine der Arbeiten, die sich bis heute mit der fluoreszenztechnischen Darstellung des Y - Chromosoms bei Haussäugetieren beschäftigt haben.

BHATTACHARYA und seine Mitarbeiter (1976) sahen den Grund für die gute Anfärbbarkeit von Human- und anderen Primatenspermien mit Fluorchromen darin, daß diese gegenüber anderen Spezies einen weit höheren Anteil an proteolytischen Enzymen enthalten, welche die Sialinsäure-Protein-Komplexe, Glyko- und Lipoproteine des sogenannten "Spermenschutzmantels" ablösen. Wenn die die Plasmamembran des Spermiums umhüllenden Proteine vollständig abgelöst werden können, so wird dadurch, ihrer Meinung nach, die Durchdringungsfähigkeit der Farbstoffe durch die Membran verbessert.

Die Autoren testeten daher die Wirkung verschiedener Enzyme bei verschiedenen Temperaturen, Konzentrationen, pH-Werten etc. auf Spermienhüllsubstanzen und stellten fest, daß Papaya-Protease für den beabsichtigten Zweck am besten geeignet war. Mit dieser Protease dauchten sie nun Spermien suspensionen an und färbten Ausstriche davon

anschließend mit 0,005 %-iger QM-Lösung.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachteten und beschrieben sie das Y - Chromosom von Bullen- und Hengstspermien als einen deutlichen hellen, ausgezeichnet sichtbaren Fluoreszenzkörper ("B - body"), wohingegen bei in gleicher Weise behandelten Spermien des Menschen eine tiefe, homogen über die Spermienoberfläche verteilte Färbung auftrat, die keine Identität für das Y - Chromosom gab.

Die prozentuale Häufigkeit der "B - bodies" in den Ausstrichen gaben BHATTACHARYA et al. (1976) beim Bullen mit 49,8 % und beim Hengst mit 47,3 % an.

2.2.3. Elektronenmikroskopie

Bedeutung für die Differenzierung von X - und Y - Spermien gewann das Elektronenmikroskop bei den Versuchen, den DNA-Gehalt von Spermien über die Chromosomenlängen zu berechnen (siehe Kapitel Photometrie), und bei der indirekten Darstellung von Spermienoberflächenantigenen (z.B. H-Y-Antigen) mit Hilfe Antikörper - assoziierter Viren, z.B. Tabakmosaikvirus (siehe Kapitel immunologische Verfahren).

2.3. Photometrie

2.3.1 Mikrospektrophotometrische Bestimmung des Feulgen - DNA - Komplexes

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Färbemethode, die von Feulgen und Rossenbeck im Jahre 1924 entwickelt wurde. Dabei werden die glykosidartigen Bindungen zwischen den Purinbasen und der Pentose im DNA - Molekül durch eine milde Säurehydrolyse gelöst.

Die farblose fuchinschwefelige Säure (das sogenannte Schiff'sche Reagenz) reagiert unter magentaroter Anfärbung der Spermien mit den durch die Hydrolyse freigesetzten Aldehyden. Absorptionsmessungen im sichtbaren Licht gaben anschließend Aufschluß über den DNA - Gehalt der einzelnen Samenzellen.

LEUCHTENBERGER et al. (1955) beim Menschen sowie JANSEN und LEEFLANG (1966) beim Rind haben den Feulgen-DNS-Gehalt von Spermien im Hinblick auf einen eventuellen Nachweis eines unterschiedlichen DNA-Gehaltes bei Gyno- und Androspermien untersucht.

Die Häufigkeitsverteilung der Einzelwerte ergab eine zweigipflige allerdings asymmetrische Kurve. Die Autoren glauben den mathematischen Beweis dafür erbracht zu

haben, daß diese Verteilungskurve zwei normalverteilte Populationen, also X - und Y - Spermien, darstellt, deren Mittelwerte um rund 2,26 % (Mensch) bzw. 3 % (Rind) differieren.

Die Asymmetrie, d.h. die geringere Höhe des einen Gipfels der Kurve, der vermutlich die X - Spermien repräsentiert, schreiben sie der größeren Streuung der Werte dieser Population zu.

Im Jahre 1973 stellte ANISIMOV beim Spulwurm, *Ascaris suum*, fest, daß X - Spermien 37 % mehr Feulgen-gefärbte DNA besitzen.

Anstoß zur Diskussion jedoch gaben die Feststellungen einer Reihe von Autoren, daß die Intensität der Feulgen-Färbung von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Hydrolyse- und Färbedauer, Temperatur und Dauer der Bleichung beeinflußt wird (u.a. SWIFT 1950, WALKER und RICHARDS 1957, BAEHR 1965, JANSEN und LEEFLANG 1966) und sich während der Hydrolyse einige färbbare Substanzen lösen und durch die Salzsäurebehandlung verlorengehen STEDMAN und OLDS (1961). Außerdem konnte BOUTERS (1966) am Beispiel des Kaninchens nachweisen, daß der Feulgen-DNA-Gehalt der Spermien während der Passage in den samenabführenden Wegen abfällt. Diese mit der Feulgen-Photometrie verbundenen Unsicherheitsfaktoren ließen es daher fraglich erscheinen, ob aus einer zweigipfligen Verteilungskurve der Feulgen-DNA-Werte auf einen unterschiedlichen DNA-Gehalt

der X - und Y - Spermien geschlossen werden kann.

Wegen dieser nur schwer kontrollierbaren Faktoren hielten es WALKER und RICHARDS (1957) für ratsam, bei DNA-Messungen die UV-Photometrie vorzuziehen.

2.3.2. Ultraviolettmikrospektrophotometrische Bestimmung der DNA

1936 entwickelte CASPERSSON (1936) eine Methode der Mikrospektrophotometrie im ultravioletten Licht. Sie basiert auf den Grundlagenforschungen von Miescher über die Nukleinsäuren sowie von Köhler und von Rohr über die Mikroskopie. Diese Methode erlaubt die qualitative und quantitative Bestimmung organischer Verbindungen in jeder einzelnen Zelle. Nach SANDRITTER und GROSSER (1964) gilt die UV-Photometrie als einzige Methode, welche eine Bestimmung des DNA-Gehaltes der Samenzellen in absoluten Mengeneinheiten erlaubt.

Für Absorptionsmessungen im ultravioletten Licht (260 μm , 280 μm und 313 μm) werden ungefärbte Präparate verwendet (WALKER und YATES 1952).

Die UV-Absorption der Nukleinsäuren beruht auf den ungesättigten Verbindungen der Nukleinsäurekomponenten Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin und 5-Methylcytosin. Das

Absorptionsmaximum liegt bei 260 μm .

Die UV-Absorption der Eiweißkörper wird im wesentlichen durch den Gehalt an den beiden Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bedingt. Das Absorptionsmaximum tritt bei 280 μm auf. Andere Zellsubstanzen, wie z.B. Fette und Kohlenhydrate, können wegen zu geringer Konzentration mit dieser Methode nicht erfaßt werden und bleiben damit unberücksichtigt.

Somit ergibt sich dann nach SANDRITTER (1958) für die Bestimmung des absoluten DNA-Gehaltes der Zelle folgende Formel:

$$M = u^2 (0,92 E_{260\mu\text{m}} - 0,75 E_{280\mu\text{m}} - 0,25 E_{313\mu\text{m}}) \times 10^{-12} \text{ g}$$

M Gesamtmenge der DNS in der Zelle

u^2 Zellfläche

$0,92 E_{260\mu\text{m}}$ Mittlere Extinktion der Nukleinsäuren bei 260 μm

$0,75 E_{280\mu\text{m}}$ Mittlere Extinktion der Eiweißkörper bei 280 μm

$0,25 E_{313\mu\text{m}}$ Unspezifische Absorption durch Streulicht usw.

Mit dieser Methodik untersuchten LEUCHTENBERGER und LEUCHTENBERGER (1958 a, b) und STOLLA (1968) die DNA-Gehalte von Menschen- und Rinder- bzw. von Schweine-spermien.

Beide mußten jedoch feststellen, daß diese Säugetier-spezies nur kleine Unterschiede im Chromatingehalt aufweisen (2,8 %; 4,2 %; 3,6 %).

2.3.3. DNA - Gehaltsmessungen mit dem Elektronenmikroskop

Für die beste Methode, Unterschiede im DNA-Gehalt zwischen X - und Y - Spermien nachzuweisen, wird heute das Messen der Chromosomenlängen mit dem ELEKTRONEN-MIKROSKOP gehalten (MOSES 1977 a-c, SOLARI und ASHLEY 1977).

Dabei errechnet sich der DNA-Gehalt aus axialen Chromosomenmessungen, wobei man annimmt, daß die Chromatiden Zylinder gleicher Dichte und gleichen Durchmessers sind.

MORUZZI (1979) untersuchte auf diese Weise 524 verschiedene Spezies, die wie er berichtet, DNA-Gehaltsunterschiede zwischen X - und Y - Spermien von mindestens 6,20 % aufweisen. Die größte Differenz fand er bei *Apodemus sylvaticus* mit ungefähr 9,3 %.

2.4. Galvanische Verfahren

2.4.1. Elektrophorese

Diese Methodik stützt sich darauf, daß die beiden Spermientypen (Gynospermien und Androspermien) zum einen eine positive, zum anderen eine negative elektrische Oberflächenladung besitzen, aufgrund dessen sie im elektrischen Feld zur Anode, bzw. Kathode wandern (nicht schwimmen!).

Bei Versuchen dieser Art wurden sowohl Makro- als auch Mikroelektrophoreseapparate verwendet.

Erste Elektrophorese-Versuche mit Spermien dreier verschiedener Echinodermata-Arten und einer Anzahl von Säugetierspezies unternahmen MUDD und MUDD im Jahre 1929. Dabei stellten sie fest, daß alle Spermien im elektrischen Feld mit dem Schwanzteil voraus zur Anode hin wanderten.

Diese Autoren machten auch erstmals Antikörperversuche mit Spermien und konnten bei Säugetierspermien neben einer Gewebespezifität auch eine Speziesspezifität nachweisen.

MACHOWKA und SCHEGALOFF beobachteten 1935 bei ihren Versuchen mit einer Mikroelektrophoresekammer:

1. eine spontane Paralyse der zunächst beweglichen Spermien bei hohen Potentialdifferenzen und darauf-

- hin eine spontane Wanderung zur Anode,
2. bei niedriger Potentialdifferenz eine Wanderung der unbeweglichen bzw. toten Spermien zur Anode - der motilen Spermien jedoch aufgrund offensichtlicher negativer Galvanotaxis zur Kathode hin.

Sie schlossen daraus, daß die Wanderung von Spermien in der Elektrophoresekammer auf eine passive elektrophoretische Wanderung sowie eine aktive Galvanotaxis zurückzuführen sein muß. Darüberhinaus vermuteten sie, daß alle lebenden Spermien eine negative Ladung tragen und nur bei ungünstigem Milieu eine Zerstörung der Lipidkomponente der Zellmembran eine positive Oberflächenladung verursachen kann.

Im Jahre 1941 berichtete schließlich SCHRÖDER erstmals von einer erfolgreichen Trennung von Kaninchenspermien im elektrischen Feld. Sie besamte Kaninchen mit dem vorbehandelten Sperma und stellte nach Verwendung von Kathodensperma einen erhöhten Anteil an männlichen, nach Insemination mit Anodensperma aber eine Häufung der weiblichen Nachkommen bis zu 80 % fest.

Viele Wissenschaftler wiederholten daraufhin SCHRÖDERs Experimente mit Kaninchen- und anderen Säugerspermatozoen.

KORDTS (1952) und PILZ (1952) unternahmen eine Reihe von Untersuchungen mit einer Mikroelektrophoresekammer

bei einer Potentialdifferenz von 80 - 90 Volt, blieben jedoch bei der Trennung von X - und Y - Spermien erfolglos.

PILZ (1952) untersuchte Kaninchen-, Rinder- und menschliche Spermien und beobachtete, daß Kaninchen- und Rinderspermien im elektrischen Feld zur Kathode, menschliche Spermien jedoch zur Anode wanderten. Tote und inaktive Spermien wanderten seinen Feststellungen zufolge sowohl zur Anode als auch zum Teil zur Kathode, woraus er summierend schloß, daß Gyno- und Androspermien auf diese Weise unter keinen Bedingungen zu trennen seien.

Im Gegensatz dazu konnten LEWIN (1956) und GORDON (1957 a, b) die Untersuchungen von SCHRÖDER (1941) nachvollziehen und deren Erfolg bestätigen. Ihre Ergebnisse waren zwar nicht in gleichem Maße überzeugend, aber auch nicht von der Hand zu weisen.

GORDON (1957 a, b) erreichte bei 113 Würfen künstlich besamter Kaninchen ein Verhältnis von 62 weiblichen zu 25 männlichen Nachkommen bei "Anodenspermien" (71,3 %) und 51 männlichen zu 29 weiblichen Nachkommen bei "Kathodenspermien" (63,7 %).

VESSELINOVITCH (1959 a-c) stellte sich schließlich die Frage, inwieweit bestimmte Potentialdifferenzen und Suspensionsmedien einen Einfluß auf das Verhalten von Spermien im elektrischen Feld haben.

Er setzte sowohl reines Rindersperma, als auch in verschiedenen Puffern, wie Krebs-Henseleit-Ringer-Lösung, "treated-milk"-Puffer, modif. Schröder-Lösung, suspendierte Spermienproben verschiedenen Potentialdifferenzen aus und stellte fest, daß

a) bei der Krebs-Henseleit-Ringer-Suspension

1. ab 30 bis 190 Volt die Motilität der Spermien proportional zur Spannungsänderung größer wurde und im Bereich zwischen 190 bis 250 Volt bis zur Unbeweglichkeit wieder abnahm,
2. sich ab 30 Volt alle unbeweglichen ebenso wie alle toten Spermien zur Kathode bewegten,
3. sich ab 45 Volt die Spermien derart orientierten, daß ihre Geißeln zur Kathode ausgerichtet waren (Galvanotaxis),
4. solchermaßen orientierte Spermien mit erhaltener Motilität aktiv zur Anode schwimmen oder beim Gleichgewicht der Kräfte von Fortbewegung und zur Kathode hin gerichteter Kraft im elektrischen Feld "auf der Stelle stehen" bleiben;

b) bei "treated-milk"-Puffer-Suspensionen und unver-

dünntem Sperma wegen der allzuvielen Fetttropfen zum einen sowie der hohen Spermiedichte zum anderen keine nennenswerten Beobachtungen zu machen waren;

c) bei modifizierten Schröder-Puffer-Suspensionen sich die Beobachtungen bei vier mit Sörensen-Puffer-Lösung

eingestellten pH-Werten von 7,2; 6,8; 6,45 und 5,0 mit dem unter a) berichteten deckte.

SCHRÖDER (1941) erklärte ihre Beobachtungen damit, daß die Wanderung der X - sowie Y - Chromosomen tragenden Spermien im elektrischen Feld (zur Anode oder Kathode) auf verschiedene elektrische Oberflächenladungen und Ladungsdichten zurückzuführen ist, so daß letztendlich aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte X - und Y - Spermien in einer Pufferlösung bei einem bestimmten pH zu den entgegengesetzten elektrischen Polen wandern. VESSELINOVITCH (1959 a-c) widersprach neben anderen (KORDTS 1952, PILZ 1952) diesen Schlußfolgerungen, da er das von ihr beschriebene Phänomen nie reproduzieren konnte und führt deren "falsche" Beobachtungen auf die bei der von ihr, aber auch von GORDON (1957 a, b) verwendeten Kross-Zuelzer-Mikroelektrophorese kammer auftretende elektroosmotische Aktivität zurück.

Daraus ergeben sich seiner Meinung nach als Ursachen für die Wanderung der Spermien zu beiden Polen neben der elektrophoretischen Kraft auch der passive osmotische Fluß.

Nie konnte er, wie MACHOWKA und SCHEGALOFF (1935), eine deutliche negative Galvanotaxis bei der Mehrheit aller beweglichen, lebenden Spermien beobachten.

Aus diesen verschiedenen Erkenntnissen leitet er sieben Punkte ab, welche einen Einfluß auf die elektrophoretische Trennung von Spermien haben:

1. die Art der Elektrophoresekammer
2. Galvanotaxis
3. Motilität der Spermien
4. hydrodynamischer Fluß
5. Wärmefluß
6. Rheotaxis
7. Elektroosmose.

Im Jahre 1961 versuchte NEVO, durch Versuche mit Kaninchen- und Rinderspermien im Elektrophoresefeld in einem weiten pH-Bereich bei konstanter Ionendichte die Erkenntnisse und Thesen von VESSELINOVITCH (1959 a-c) belegen und bestätigen zu können. Da elektrophoretische Motilitätsmessungen nur bei unbeweglichen Spermien vorgenommen werden können, weil die Eigenmobilität der Spermien die elektrophoretische Kraft sowohl summierend, als auch subtrahierend beeinflussen kann und somit die Ergebnisse verfälschen würden, inaktivierte er die motilen Spermien kurzzeitig durch a) niedere Temperaturen (um 4°C) oder b) durch CO_2 -Begasung bei Raumtemperatur.

In beiden Fällen konnte die Beweglichkeit vollständig wiederhergestellt werden und die Oberflächenladung

blieb durch den Inaktivierungsvorgang unbeeinflusst.

Eine reversible Inaktivierung konnte auch im elektrischen Feld erreicht werden - jedoch nur bei hoher Stromstärke, welche aber die Flüssigkeit in der Elektrophoresekammer durch Konvektionsströme erhitzt, so daß die elektrophoretische Wanderung sich nicht mehr deutlich darstellte.

Eine Stromstärke von $0,3 \text{ Ampere/cm}^2$ bei einer Feldstärke von $29,5 \text{ V/cm}$ inaktivierte die Zellen nach 40 - 50 Sekunden.

Die Spermien sind, wie er feststellte, elektrophoretisch homogen mit einer Normalverteilung der Beweglichkeit in einem ziemlich engen Schwankungsbereich, was heißt, daß die Motilitätsbestimmungen innerhalb von $\pm 2 \%$ Abweichung reproduzierbar waren.

Die elektrophoretische Beweglichkeit ursprünglich unbeweglicher und inaktivierter Spermien derselben Probe war die selbe. Das traf auch auf Spermien in der Samenflüssigkeit (ohne Zusätze), bei Zusatz von Eigelb und nach dem Waschen zu. Der isoelektrische Punkt (IEP) der Spermienoberflächenladung wurde von ihm bei $\text{pH } 3,4 \pm 0,05$ ermittelt. In Suspensionen, die mit einer Vielzahl von Pufferlösungen bei pH-Werten zwischen 2,5 - 8,5 hergestellt wurden, ließen sich weder bei Rinder- noch bei Kaninchenspermien positiv

und/oder negativ geladene Spermien nachweisen.

Im Bereich über dem IEP beobachtete er ebenfalls eine passive elektrophoretische Wanderung zur Anode mit nach vorwärts gerichtetem Schwanzteil. Unter dem IEP wanderten die Spermien zur Kathode.

Wie nachgewiesen wurde, haben Spermienkopf und -schwanz über dem IEP eine negative Nettoladung, wobei der Schwanz offensichtlich die höhere Ladungsdichte aufweist. Dies liegt nicht zuletzt deshalb nahe, da von den Köpfen getrennte Spermienchwänze eine höhere passive Beweglichkeit im elektrischen Feld aufweisen als die abgetrennten Köpfe und der Fortbewegungsgrad unversehrter Spermien dazwischen einzuordnen ist.

Bei beweglichen Spermien wurde überwiegend eine Galvanotaxis in Richtung Kathode, der entgegengesetzten Richtung zur elektrophoretischen Migration, festgestellt.

Nachdem nun dieses Verfahren zunächst von vielen Wissenschaftlern im Hinblick auf die Trennung von Gyno- und Androspermien als wirkungslos abgetan wurde, LAIRD (1962/1963/1964), SEVINC (1968), KIDDY und HAFS (1970), HAFS und BOYD (1971) aber in den folgenden Jahren erneut von Erfolgen berichten konnten, versuchten zuletzt SHISHITO et al. (1974/1975) eine Trennung menschlicher X - und Y -

Spermien im elektrischen Feld.

Sie verwendeten eine Mikroelektrophoresekammer bei einem konstanten Gleichstrom von 2,3 V und 200 μ A. Die Experimente wurden bei Zimmertemperatur und ohne Immobilisierung der Spermatozoen durchgeführt. SHISHITO et al. (1974, 1975) konnten eine fluoreszenztechnisch nachgewiesene Anreicherung an X - Spermien reduzierter Motilität von 81 - 99 % an der Kathode sowie einen erhöhten Anteil an Y - Spermien von 66 - 74 % mit gesteigerter Motilität an der Anode feststellen, so daß dieser Methodik bis heute ihre Effizienz zumindest als beeinflussender Teilfaktor (siehe Convection Counter Streaming Galvanization Technique) nicht abgesprochen werden kann.

2.4.2. Convection Counter Streaming Galvanization Technique

Bei diesem von BHATTACHARYA (1979) modifizierten Sedimentationsverfahren wird das Trennmedium und damit auch die zu trennenden Partikel (z.B. Zellen) zusätzlich einem elektrischen Feld ausgesetzt (s. Kap. Zentrifugations- und Sedimentationsverfahren).

Zusammenfassender Überblick über die bisher veröffentlichten
Arbeiten

Elektrophoretische Wanderung	untersuchte Spezies	Autoren
Wanderung ausschließ- lich zur Anode	Mensch, Ratte, Meer- schweinchen, Rind, Schaf, Kaninchen und drei Echinodermata	MUDD und MUDD (1929)
	Kaninchen	MACHOWKA und SCHEGALOFF (1935)
	Mensch	JÖEL et al. (1951) PILZ (1952)
Wanderung ausschließ- lich zur Kathode	Rind, Kaninchen	PILZ (1952)
	Rind (pH 5,0 bis 7,2)	VESSELINOVITCH (1959)
Wanderung zu beiden Elektroden	Pferd, Kaninchen (pH 7,1)	SCHRÖDER (1941)
	Kaninchen, Mensch	LEWIN (1956)
	Kaninchen (pH 7,1)	GORDON (1957)
	Rind, Kaninchen	NEVO et al. (1961)
	Rind	LAIRD (1964)
	Kaninchen	SEVINC (1968)
	Säugerspermien	HAFS und BOYD (1971)
	Mensch	SHISHITO et al. (1974, 1975)

2.5. Zentrifugations- und Sedimentationsverfahren

2.5.1. Zentrifugation

Der auffallende Größenunterschied zwischen den beiden Geschlechtschromosomen vom Menschen und einiger Haustiere führte zu der Arbeitshypothese, daß sich die X- und Y-Spermien in ihrer Dichte und Masse unterscheiden (HARVEY 1946, JORDANO 1952). Diese Hinweise veranlaßten LINDAHL (1956, 1958), mit Hilfe der Gegenstromzentrifugation Trennungsexperimente an Bullenspermien anzustellen. Bei einer Zentrifugation mit 1100 rpm war ein starker Rückgang der Motilität und Befruchtungsfähigkeit zu beobachten. Bis zu 1000 rpm blieben die Spermien unbeeinflusst. Die Insemination mit so vorbehandelten Samenproben erbrachten eine, allerdings nicht signifikante Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses. Die Verwendung von "schweren" X-Spermien vergrößerte den Anteil der Kuhkälber, die "leichteren" Y-Spermien führten dagegen zu einem erhöhten Prozentsatz an Stierkälbern.

QUINLIVAN et al. (1975) versuchten, das von LINDAHL (1956) erstmals beschriebene Verfahren mit Spermatozoen vom Menschen nachzuvollziehen. Er zentrifugierte Spermien-suspensionen bei 800 rpm ($g_{\max} = 120$), konnte jedoch

nur eine minimale Anreicherung beider Fraktionen von $\pm$ 1 - 2 % nachweisen.

Es erschien somit fraglich, ob die mit der Zentrifugationsmethode durchgeführte Aufteilung der Spermien in "leichte" und "schwere" Samenzellen mit einer Trennung der X - und Y - Spermien gleichgesetzt werden kann.

Das unterschiedliche spezifische Gewicht der Spermien, welches von BHATTACHARYA (1962) allein auf den Größen-
dimorphismus der Geschlechtschromosomen zurückgeführt wird, erklären sich nämlich andere Autoren (LINDAHL und KIHLSSTROM 1952, LAVON 1966) als Folge der Reifungs- und Alterungsprozesse der Spermien in den samenabführenden Wegen. Da aber gezeigt werden konnte, daß in einem Ejakulat immer Samenzellen verschiedenen Alters enthalten sind (KOEFOED - JOHNSON 1960), war und ist es heute noch zweifelhaft, ob die von LINDAHL (1956) beschriebene Zentrifugationstechnik dazu geeignet ist, X - und Y - Spermien zu trennen.

2.5.2. Dichtegradientenzentrifugation

Nachdem im Jahre 1971 SUMNER et al. den Nachweis eines höheren DNS-Gehaltes sowie einer größeren Kerntrockenmasse bei menschlichen X - Spermien erbringen konnten,

glaubten einige Wissenschaftler erneut, beide Spermientypen unter Ausnutzung ihrer unterschiedlichen Dichte mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation geschlechtsspezifisch anreichern zu können. Dies mißlang ROHDE (1975 a, b) mit einer Kältezentrifugation (4°C) von 12 000 bis 77 500 g und einem Saccharosegradienten zwischen 30 und 60 %. Er konnte keinen Einfluß auf die Häufigkeit der auftretenden "F - body" positiven menschlichen Spermatozoen in den von ihm festgestellten fünf verschiedenen Fraktionszonen nachweisen.

PORSTMANN et al. (1978) führten morphometrische Untersuchungen an Kopf- und Kernflächen von menschlichen X - und Y - Spermatozoen eines normospermen Ejakulats durch. Die Kopfflächen beider Spermienpopulationen betrugen im Mittel $9,81\text{ }\mu\text{m}^2$. X - Spermien wiesen eine um 7,2 % größere Kernfläche gegenüber Y - Spermien auf. Da jedoch die Streuung der Kernflächen beider Spermientypen um ihren Mittelwert das 2,5 - fache der Mittelwertdifferenz betrug, ergab die Summenkurve keine bimodale Verteilungskurve.

Somit könnte der Unterschied zwischen den Kernflächen X - und Y - Chromosomen tragender Samenzellen nur an geschlechtlich differenzierbaren Spermien erhoben werden.

Dieses Ergebnis veranlaßten PORSTMANN et al. (1978) trotz des Mißerfolges von ROHDE (1975 a, b), gestützt auf die Veröffentlichungen von SUMNER et al. (1971), THORMÄLEN (1973) sowie SCHLLING und THORMÄLEN (1977), Experimente zur Trennung menschlicher Spermatozoen mittels einer isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation durchzuführen.

In diesen Versuchen war es ihnen möglich, mehrfach in Krebs-Ringer-Lösung gewaschene ungepoolte und gepoolte Samenzellen normospermer Proben in einem diskontinuierlichen 30 bis 60 %-igen Saccharosegradienten bei Beschleunigungen von 12 000 bis 77 500 g (in Anlehnung an ROHDE 1975 a, b) zu trennen.

Die in allen Versuchsansätzen vorhandenen signifikant höheren Prozentsätze an Y - Spermien in den Fraktionen geringerer Dichte im Vergleich zu den korrespondierenden Werten in den Kontrollausstrichen ("F - body - Test") und in den Fraktionen höherer Dichte konnte er durch Varianzanalyse und Duncan-Test absichern.

Dabei zeigte sich, daß ungepoolte und gepoolte Samenzellen auf die Verteilung der Zellzahl sowie das Verhältnis von X - und Y - Spermatozoen in den einzelnen Fraktionen keinen Einfluß hatte.

Die durchschnittliche Anreicherung der Y - Spermien lag bei 79,6 %, die der X - Spermien bei 68,2 %. Als Ursache für die geringere Anreicherung der X - Spermien kommen

für sie "Verunreinigungen" der Spermienfraktionen hoher Dichte durch Samenzellaggregate, die sowohl X - als auch Y - Samenzellen enthalten, in Betracht.

Auch HEDGE et al. (1978) berichteten noch im selben Jahr von einer Anreicherung menschlicher Y - Spermatozoen von bis zu 70 % im Sediment eines Zentrifugationsversuches bei 100 g (20 min) mit einer Mischung aus 2,4 ml 8 %-iger Ficoll 400 - und 1 ml 33,8 %-iger Sodiummetrizonatlösung ($\rho = 1,080$).

Nachdem es LUDERER et al. (1979) mit Hilfe thixotroper, wasserunlöslicher Gele genau definierter Dichte gelungen war, Lymphozyten von anderen geformten Blutelementen (z.B. Monozyten) aufgrund kleinster unterschiedlicher Massenverhältnisse zu trennen, untersuchte er mit seinen Mitarbeitern (1982) in gleicher Weise die Trennung von Rinderspermiesuspensionen. Dabei bleiben Zellen geringerer Dichte als das Gel nach der Zentrifugation in oder über der "gelgleichen" Zwischenphase. Zelluläre Elemente höherer Dichte passieren das Gel und sedimentieren am Boden des Versuchsgefäßes.

LUDERER et al. (1982) verwendeten Newtonsche Gele spezifischer Dichte auf der Basis von Hydrocarbon- und Silikonbasen. Nach Zentrifugationen bei 5 000 und 62 000 g (25000 rpm), 22 °C und einer Zentrifugationsdauer von 1 Stunde, wurde das Sediment nach Durchstoßen des Gels abpipettiert.

Bei einer Dichte von 1075 - 1090 (g/cm^3) konnte individualspezifisch (Bulle A, B, C) eine zahlenmäßige Auftrennung der Spermien zu je gleichen Teilen "über" und "unter" der Gelphase erreicht werden.

Diese Spermienfraktionen wurden anschließend mit Hilfe der künstlichen Besamung im Feldversuch auf ihre Geschlechtsspezifität hin überprüft. Das ermittelte Geschlechterverhältnis in beiden Testgruppen von 50,4 % stimmte allerdings mit den von FOOTE (50,8 %, 1977) sowie CADY und VAN VLECK (50,9 %, 1978) in großen Milchviehpopulationen festgestellten Werten überein.

Daraus schlossen LUDERER et al. (1982), daß zufällige Differenzen in der Spermienzellichte, vor allem in den Extrembereichen der Dichteverteilung innerhalb einer Spermienpopulation, X - oder Y - chromosomal korrelierte Unterschiede überspielen.

2.5.3. Sedimentationsdichtegradientenzentrifugation

In Anlehnung an die modifizierten Sedimentationsverfahren nach ERICSSON (1973 - siehe Abschnitt 2.5.5.) wurde von PORSTMANN et al. (1978) als schonendes Verfahren zur Trennung von menschlichen Spermien die Sedimentations-

dichtegradientenzentrifugation (bei niederen g-Zahlen) überprüft.

Die optimale, geschlechtsspezifische Spermienverteilung im kontinuierlichen und diskontinuierlichen isotonen Dextrangradienten fanden sie in einem 7-stufigen 6 - 24 %-igen Dextrangradienten bei einer Zentrifugationsdauer von 15 Minuten und 900 g. Zwischen den einzelnen Fraktionen lagen statistisch gesicherte Unterschiede im Anteil an Androspermien vor. Hierbei unterschieden sich sowohl die andro- als auch gynospemienreichen Fraktionen mit durchschnittlich 68,2 % bzw. 62,5 % in den Einzelversuchen von ihren Kontrollen.

Obgleich bei der Ultrazentrifugation (s. Abschnitt 2.5.2.) eine etwas stärkere Anreicherung der Y - Spermatozoen erreicht wurde, stellten PORSTMANN et al. (1978) fest, daß die Zellzahl in den Y - spermienreichen Fraktionen bei der Sedimentationsdichtegradientenzentrifugation mit etwa 10 % gegenüber 5 - 7 % bei der Ultrazentrifugation geringfügig höher war.

Morphologische Untersuchungen zeigten außerdem eine erhebliche Schädigungsrate der Spermien in den einzelnen Fraktionen bei Verwendung hoher g-Zahlen und des osmotisch aktiven Trennmediums Saccharose, während die Schädigungsrate bei niederen g-Zahlen im isotonen Dextrangradienten wesentlich geringer war und eine relativ gleichmäßige Verteilung über die einzelnen Fraktionen sichtbar war.

2.5.4. Sedimentation

Einen ähnlichen Weg wie LINDAHL (1952) (s. Abschnitt 2.5.1.) beschritt auch BHATTACHARYA (1958, 1962, 1966), indem er, ausgehend vom Größendimorphismus der Geschlechtschromosomen und dem damit verbundenen Dichteunterschied der X - und Y - Spermien, ein Sedimentationsverfahren zur Trennung der Samenzellen anwendete.

Bei dieser Methode durchlaufen die Spermien 24 Stunden lang ein kolloidales Medium aus Eigelb bzw. Milch und Glykokoll. Wegen ihrer unterschiedlichen Fallgeschwindigkeit unter dem Einfluß der Schwerkraft sollen seiner Meinung nach die Spermien, wenn sie bei 10 °C immobilisiert wurden, nach dem Sedimentationsprozeß in mehreren Fraktionen in der Sedimentationssäule angeordnet sein.

Versuche mit derart vorbehandeltem Kaninchensperma (1958 und 1962) ergaben tatsächlich eine eindeutige Verschiebung des Geschlechterverhältnisses. Erwartungsgemäß überwogen nach künstlicher Besamung mit "schweren" Spermien aus den untersten Fraktionen Weibchen, nach Besamung mit "leichten" Spermien aus den obersten Fraktionen Männchen.

Das beschriebene Verfahren wandte BHATTACHARYA (1966)

auch bei Rindern an - jedoch ohne Erfolg.

SCHILLING (1966, 1967) führte die Versuche BHATTACHARYAS mit modifizierter Methodik weiter. Es gelang ihm, ein spermienfreundliches Medium zu entwickeln, das nicht nur die Auftrennung der Samenproben in verschiedene Fraktionen ermöglichte, sondern auch die normale Befruchtungsfähigkeit der vorbehandelten Spermien erhält.

SCHILLING (1967) führte nur Besamungen mit "schweren" Spermien aus den beiden untersten Fraktionen durch, wobei bei einer Konzeptionsrate von 66,9 % nach der ersten Besamung die Anzahl der weiblichen Kälber bei 96 Geburten 60 betrug, was einem Prozentsatz von 69,8 % entspricht.

In Anlehnung an die Arbeiten von BHATTACHARYA und SCHILLING versuchten BEDFORD und BIBEAU (1967), mit dem von SCHILLING verwendeten Sedimentationsapparat und dessen Medium (76 g Milchpulver in 64 ml aqua dest., 13 ml Glukose (3,75 %), 13 ml Sodiumcitrat (2,9 %), 18,5 ml Eigelb, 1 ml warme Gelatine und 2 ml wässrige Lösung von je 0,5 mg Penicillin und Streptomycin) dieses passive Sedimentationsverfahren mit Kaninchenspermien nachzuvollziehen, blieb aber ohne Erfolg.

2.5.5. Dichtegradientensedimentation

1973 berichteten ERICSSON et al. von der Möglichkeit, menschliche X - von Y - Spermatozoen isolieren zu können, wenn man sie einem Medium bestimmter Dichte, wie BSA (bovine serum albumin) oder Ovalbumin, aufschichtet.

Die Grundvoraussetzung für diesen Isolierungsvorgang ist die progressive Motilität der Spermien, ohne die keine Trennung von X - und Y - Spermien aufgrund der von ROBERTS (1972) beschriebenen unterschiedlichen Vorwärtsbewegung beider Spermatozoatypen erfolgen kann.

Bei dieser Trennmethode werden 0,5 ml einer Spermien-suspension standardisierter Zellkonzentration einer in eine Glassäule gefüllte Albumin-Tyrode s-Lösung aufgeschichtet und nach einer Sedimentationszeit von 1 Stunde die Oberflächenfraktion abpipettiert.

Die Autoren testeten verschiedene Albuminkonzentrationen von 3 - 25 % bei pH-Werten von 7,4 - 7,6, wobei sie bei einer 20 %-igen Lösung ein Anreicherungsoptimum an Y - Spermatozoen im abzentrifugierten Sediment erreichen konnten.

Darüberhinaus versuchten sie durch zwei oder drei aufeinanderfolgende Sedimentationen bei Konzentrationen von 6, 10, 20 % (Zwei- oder Dreistufenverfahren) und

durch die Dreischichtentechnik (drei übereinandergeschichtete Albuminlösungsfraktionen verschiedener Konzentrationen - 25, 15, 10 % - in einem Sedimentationsgefäß) den Anreicherungsgrad zu verbessern. Tatsächlich konnten sie beim "Stufenverfahren" eine Anreicherung von 76 % - beim Dreischichtenverfahren sogar bis 85 % - Androspermien fluoreszenztechnisch nachweisen.

Obwohl ERICSSON und Mitarbeiter (1973) einen praktischen Weg gefunden hatten, Y - Spermien zu isolieren, konnten sie gleichartiges bei X - Spermatozoen nicht erreichen.

Die Ursache hierfür sah ERICSSON darin, daß nicht alle Spermien am Isolierungsprozeß teilhaben. Bezugnehmend auf die Arbeit von ROBERTS (1972), der die Möglichkeit einer Trennung motiler Spermien mittels Sedimentation anhand mathematischer Modelle aufgrund der angenommenen größeren Schwimmfähigkeit der Y - Spermien als eine Funktion der Zeit aufzeigte und aufgrund der Feststellung, daß nur 25 - 35 % der organären Samenzellsuspension im Isolationsmedium eindringen sowie der Trennprozeß von Faktoren wie Zeit, Wegstrecke und verschiedenen Mediumviskositäten abhängt, hielt er eine vergleichbare Trennung der X - Spermien mit dieser Methodik für unmöglich.

Zugleich wurde aber aufgrund seiner Ergebnisse, motilen

Y - Spermien bei einer gerichteten Schwimmbewegung nach unten (aktive Sedimentation), bei welcher der Viskositätsunterschied zwischen Samenzellen und dem Trennmedium groß genug gewählt wurde, um eine Phasengrenze zu erzeugen, die darüberhinaus auch motile von toten Spermien zu trennen vermag, eine größere Fähigkeit zugeschrieben, Phasengrenzen zwischen Flüssigkeiten und verschiedenen Trennmedien zu durchdringen. Somit müssen Y - Spermien in der Lage sein, in einer Flüssigkeit höherer Dichte und Viskosität schneller als X - Spermien schwimmen zu können.

EVANS et al. (1975) sowie ROSS (1975) konnten jedoch ERICSSONS (1973) Erfolg nicht nachvollziehen und bestätigen. Erst 1978 berichteten BROER et al. mit modifizierten Versuchsansätzen von einer signifikanten Anreicherung an Y - Spermien von 78 %. Außerdem konnten sie, wie übrigens auch EVANS (1975) und ROSS (1975) eine deutliche Verbesserung der prozentualen Motilität feststellen.

In den letzten Jahren konnten schließlich DMOWSKI (1979 a, b) und QUINLIVAN et al. (1982) - zum einen im 2-Stufen-Verfahren, zum anderen mit einer Lösungskonzentration von 35 % (BSA) - ebenfalls Erfolge (65 - 72 % $\pm$ 10 %); 74 % - aber Motilitätsverlust!) bei der Trennung menschlicher Spermatozoen aufzeigen, so daß diese Metho-

dik heute als das zuverlässigste sowie klinisch praktikabelste Verfahren angesehen wird.

5.6. Convection Counter Streaming (Sedimentation)
Galvanization Technique (CCSGT)

Die Vermutung, daß zwischen X - und Y - Spermatozoen eine phänotypische Varianz besteht, gründet sich auf ihren genotypischen Unterschied, den X - und Y - Chromosomen.

Die Grundvorstellung, das Y - Spermium sei leichter als das X - Spermium, blieb bis heute unwiderlegt.

Dennoch kann dieser Unterschied in Größe und Volumen sehr schnell durch Metaboliten, die in die Zellwand eingefangen werden, variiert, neutralisiert oder ins Gegenteil verkehrt werden.

So könnten Metaboliten wie CO_2 , H_2O_2 , NH_3 etc. durchaus eine Erhöhung des Volumens mit einer daraus resultierenden Dichteänderung bewirken.

BHATTACHARYA (1970) zeigte, daß der Dimorphismus der Spermatozoen am besten beobachtet werden kann, wenn sie sofort nach der Ejakulation fixiert werden. Unter diesen Bedingungen sind die Zellen in ihrer Fähigkeit, Materialien

aus dem sie umgebenden Milieu aufzunehmen oder Metaboliten zu synthetisieren, fast gänzlich eingeschränkt.

ROBERTS (1970) berichtete, daß motile Mikroorganismen (Flagellaten) sich in einer Flüssigkeitssäule geringer Dichte an der Oberfläche ansammeln, aber auf den Säulengrund sedimentieren, wenn sie zuvor zwischen 0 und 20° C immobilisiert wurden.

DREVIUS und ERICSSON (1966) beobachteten den Einfluß osmotischen Drucks auf die Verteilung der Zellen im Sedimentationsmuster. Demnach sind Spermien im Gegensatz zu anorganischen Isotopen und Proteinmolekülen in ihren phänotypischen Dichteunterschieden sehr leicht durch Milieubedingungen beeinflussbar.

Eine weitere vermeintlich phänotypische Eigenschaft ist der Unterschied im Elektropotential der Samenzelloberfläche. Die empirischen Beobachtungen von SCHRÖDER (1941) (s. Kap. 2.4.1.), daß Y - Spermien zur Anode, X - Spermien hingegen zur Kathode wandern, gab den Wissenschaftlern die Hoffnung, die zwei Typen von Säugerspermien im elektrischen Feld trennen zu können.

Hierüber sind die Berichte sehr widersprüchlich und die Kritik richtet sich weitgehend gegen die hier angewandten Techniken (BANGHAM 1961, SHISHITO et al. 1975).

So ändert nach BHATTACHARYA (1970) ein starker Stromfluß in der Elektrophoresekammer den Unterschied zwischen den Oberflächenladungen der Spermientypen und die Zellen verlieren ihr Potential. Die meisten Autoren haben seiner Meinung nach dieses Grundkonzept bei ihren Versuchen, X - und Y - Spermien mit Hilfe galvanischer Kräfte zu trennen, übersehen.

Dennoch könnte dieses Elektropotential (sowohl positives als auch negatives) auf der Zelloberfläche mit der Dichte, dem Volumen, dem Metabolismus der Zellen, der Anhäufung von Metaboliten und dem pH des Umgebungsmilieus korrelieren.

Mit diesem Gedankengut versuchten BHATTACHARYA und EVANS (1977) in dem Versuch, das Problem der Trennung von Gyno- und Androspermien zu lösen, die Grundforderungen an ein Trennverfahren nach neuen Erkenntnissen festzusetzen:

1. partikelfreie Spermiesuspensionen, die den Metabolismus und die Hyperaktivität der Spermien kontrollieren (Universal Medium^R BHATTACHARYA 1974),
2. im Medium bei niederen Temperaturen (0 - 4° C) immobilisierte Samenzellen, wodurch zum einen der 2 - 5 % Gewichts- und Volumenunterschied der zwei Zelltypen, zum anderen auch die positive und negative Zelloberflächenladung erhalten bleibt,
3. eine Wärmeleitungs-Gegenstrom-Sedimentationstechnik

In Übereinstimmung mit ROBERTS (1970) vermutete BHATTACHARYA (1977), daß unter stabilen Bedingungen und Raumtemperatur (24°C) Spermatozoen horizontal entlang der Säulenlängsachse sedimentieren und dabei eine Sinkgeschwindigkeit bei immobilisierten Spermien von $0,3\text{ }\mu\text{m/s}$ erreicht wird. Unter diesen Bedingungen ist es nicht möglich, eine genügend lange Sedimentationsstrecke zu schaffen, um eine sinnvolle Trennung zu ermöglichen.

Deshalb wählte BHATTACHARYA (1977) einen laminären Wärmeleitungsstromfluß, um so die Orientierung der Spermien entlang der Säulenachse nach vertikal zu beeinflussen. Denn abhängig von diesem Einfluß und unabhängig von der Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel bilden sich zwei stationäre Agglomerate.

Die Sedimentationsgeschwindigkeit wird dadurch größer als $4,5\text{ }\mu\text{m/s}$ - d.h. - bei einer Säulenlänge von 30 cm Länge erreichen die "schweren" Spermien den Säulenboden in 2 - 4 Stunden, wobei die Trenngenaugigkeit abhängig ist von der Stärke der Leitungsströmung, der Anfangskonzentration der Zellen pro ml und der Zeit, die für eine annähernd vollständige Trennung erforderlich ist. Durch Anlegung elektrischen Feldes wird eine wirksame und bessere Trennung erreicht.

Zwei Jahre später - 1979 - veröffentlicht BHATTACHARYA das von ihm entwickelte Convection Counter Streaming Sedimentation and Galvanization Technique - Verfahren (CCSGT), eine Kombination aus Thermal Convection Counter Streaming Sedimentation und Forced Convection Galvanization, zur Trennung biologischer Isotope.

Biologische Isotope können als Zellen definiert werden, die einen identischen Gewebeursprung haben, die sich aber in der Zahl oder der Art ihrer oder eines Chromosoms unterscheiden. Die phänotypischen Unterschiede, wie Größe, Dichte und Oberflächenpotential können mit den Unterschieden physikalischer Eigenschaften anorganischer Isotope verglichen werden.

Das dem Trennverfahren zugrunde liegende Prinzip beruht nun darauf, daß gelöste Moleküle in zwei entgegengesetzte Richtungen strömen, wenn eine Temperaturdifferenz zwischen zwei angrenzenden Flüssigkeitsphasen erzeugt wird oder besteht. So kann in einer vertikalen Flüssigkeitssäule ein Gegenstrom erzeugt werden, wobei deren Peripherie abwärts, die axiale Phase jedoch aufwärts strömt. Flußrate dieser laminaren Strömungen ist in jeder Richtung von den Dichteunterschieden abhängig, die zwischen den Phasen erzeugt werden.

So beeinflußt jede Änderung der Temperaturdifferenz die Dichte und damit die Flußrate der beiden Strömungen.

Wenn nun zwei Arten von Spermatozoen, "weibliche" und "männliche", die sich geringgradig in ihrer Dichte und ihrem Volumen unterscheiden, in einer vertikalen Säule gegenläufigen Strömungen ausgesetzt werden, so werden immobilisierte Samenzellen durch die Geschwindigkeit der Gegenströmungen beeinflusst. Darüberhinaus hat jedes Partikel in Abhängigkeit von den physikalischen Auftriebskräften, der Viskosität der Flüssigkeit, der Schwerkraft sowie den Dichteunterschieden zwischen den Partikeln und dem Medium eine unterschiedliche Geschwindigkeit.

Der Effekt ist eine vertikale Orientierung der Spermien, so daß die kleinst mögliche Oberfläche erreicht wird, was in einer beschleunigten Sedimentation resultiert. Die Trennwirksamkeit wird weiterhin durch den zetapotentiellen Effekt der zwei Spermientypen verbessert, indem mit einem geeigneten Strom in Mikroamperegröße im elektrischen Feld die X - Spermatozoen zur Kathode und die Y - Spermatozoen zur Anode gezogen werden.

Der Trennapparat besteht aus einer vertikalen Glassäule, die von einem Wassermantel umgeben und coaxial mit einem Rohrsystem ausgestattet ist, in dem 10° C warmes Wasser zirkuliert, während der angrenzende Wassermantel bei 3° C gehalten wird. Die Säule hat zwei Elektrodenarme auf verschiedenen Ebenen. Eine Gleichstromquelle liefert bei 2 - 4 V eine Stromstärke von 200 - 400 μ A, um die beiden

Spermientypen in die Elektrodenzellen zu ziehen. Ein Laser-Scanning-System zeichnet die Partikelverteilung in der Trennsäule auf.

Mit dieser Methodik berichteten BHATTACHARYA und seine Mitarbeiter in den Jahren zwischen 1976 und 1981 von signifikanten Erfolgen bei der Trennung von menschlichen und Rinderspermatozoen, wobei seiner Meinung nach durch einfaches Wiederholen des Trennvorganges sich eine 100 %-ige Trennung erreichen läßt - dabei sich aber die Schwierigkeit ergibt, lebensfähige Spermien in ausreichender Quantität sammeln zu können, um die Möglichkeit einer klinischen Anwendung zu gewährleisten. Daher empfiehlt er einen Trennungsgrad von 80 % bei Gewährleistung guter Konzeptionsraten.

Zur Auswertung seiner Trennerfolge verwendete er den "F - body - Test" (Mensch), den "B - body - Test" sowie künstliche Inseminationsversuche (Feldversuche) beim Rind.

Schon ein Jahr später stellten DANIELL et al. (1982) Untersuchungen zur Überprüfung des Verfahrens von BHATTACHARYA an.

Zum Universal-Medium kommentiert er, daß es die puffernden Substanzen wie Glyzerin, Alanin, Lecithin und andere biologisch aktive Peptide aus Eigelb und Antibiotika außer den Lysinen wie Lysozyme oder Lysolecithin

des Eigelbs sowie keine Partikel über 0,2 µm enthält und damit gut sterilisierbar ist. Durch seine Isotonizität und gute Pufferkapazität im Neutralbereich ist das Medium für alle Säugetierarten gut geeignet.

Bei der Trennung von Spermien des Menschen konnten sie jedoch die Werte von BHATTACHARYA nicht erreichen (Kathode -X-: 67 - 88 %; Anode -Y-: 68 - 92 %).

Nach Meinung von DANIELL et al. (1982) wurde mit dem CCSGT ein Verfahren entwickelt, das im Gegensatz zur Methode nach ERICSSON et al. (1973 - s. Abschnitt 2.5.5. -), bei der nur Y - Spermien angereicherte Fraktionen gewonnen werden können, sowohl eine Anreicherung der Y - als auch der X - Spermien ermöglicht.

Die Rolle, die galvanische Methoden und Sedimentationsverfahren bei der Trennung von Gyno- und Androspermien spielt, ist schwer zu beurteilen.

BHATTACHARYA (1966) und SCHILLING (1966, 1967) (s. Kap. 2.5.4.) wollen mit Insemination durch Sedimentation getrennter Spermienfraktionen beim Rind das Geschlechterverhältnis der Nachkommen bis zu 75 % beeinflussen haben. SHISHITO et al. (1974, 1975) (s. Kap. 2.4.1.) konnten beim Menschen eine Anreicherung der beiden Spermientypen von 80 % in einer Mikroelektrophoresekammer erzielen, die mit Hilfe des "F - body - Test" ermittelt und belegt wurde.

Durch die Kombination beider Verfahren konnte schließlich BHATTACHARYA eine 10 %-ige Steigerung der Trennungseffektivität erreichen und die Möglichkeit einer 100 %-igen Trennung in Aussicht stellen.

Dennoch scheint auch diese Methodik nicht ohne weiteres reproduzierbar zu sein (DANIELL et al. 1982), so daß auch hier noch weitere Untersuchungen und statistisch relevante Ergebnisse abgewartet werden müssen.

.6. Progressive Motilität von Spermien in Abhängigkeit von pH und Medium

Die Frage, ob sich X - oder Y - Spermien in ihrem physiologischen Verhalten unterscheiden, wurde in einem damals aufsehenerregenden Bericht von UNTERBERGER (1930) postuliert. Schon FÜRST (1881), PRYLL (1916) und SIEGEL (1916) vermuteten vor ihm solches aufgrund klinischer Beobachtungen. UNTERBERGER (1930) erzielte durch alkalische Scheidenspülungen, die vor dem Koitus durchgeführt wurden, bei Frauen in 53 Fällen ausschließlich Knabengeburten.

Ähnliche Versuche mit Kaninchen (UNTERBERGER und KIRSCH 1932), Mäusen (SCHAEFER 1937) und Ratten (ROBERTS 1940) bestätigten die von UNTERBERGER am Menschen gewonnenen Ergebnisse.

Umgekehrt konnte ROBERTS (1940) durch Scheidentouchierungen mit schwach sauren Lösungen eine erhöhte Anzahl weiblicher Nachkommen bei Ratten erreichen.

Die Ursache für die Veränderung des Geschlechterverhältnisses glaubte man in einer durch das alkalische bzw. saure Milieu bedingten Bevorzugung der männlichen bzw. weiblichen Spermien suchen zu müssen.

Allerdings blieben diese von der Tagespresse oft sensationell aufgebauchten Berichte nicht unwidersprochen. So konnten unter anderem COLE et al. (1933, 1940), BRUEGGEMANN (1940), QUISENBERRY und CHANDIRAMANI (1940, 1945) sowie CASIDA und MURPHREE (1942) weder durch Scheidentouchieren noch durch direkte Veränderungen des pH-Wertes des Spermas eine deutliche Verschiebung im Geschlechterverhältnis der Nachkommen erreichen.

Diese Befunde wurden auch durch die Veröffentlichung von EMMENS (1960) bestätigt. Letzterer erzielte nicht einmal mit Sperma, welches vor der Besamung physiologischen Extremen des pH-Bereiches ausgesetzt worden war, eine Abweichung im ausgeglichenen prozentualen Verhältnis der Geschlechter und hielt deswegen die Möglichkeit einer willkürlichen Geschlechtsbeeinflussung durch Vaginalspülungen für unwahrscheinlich.

Dennoch war es damals verfrüht, eine mögliche Beziehung zwischen der Wasserstoffionenkonzentration und der Geschlechterverteilung völlig abzulehnen. So vertrat WEIR

(1955, 1957) die Meinung, daß eine erhöhte alkalische Blutreaktion des Vaternieres (Alkalosen) den Anteil der männlichen Nachkommen bei Mäusen vergrößere.

Auch KLEEGMANN (1957) berichtete, daß zum Zeitpunkt der Ovulation der pH-Wert des Zervikalschleims am höchsten ist (7,5 - 8,0) und somit bei künstlicher Insemination in diesem Zeitraum ein prozentual höherer Anteil an männlichen Nachkommen nachzuweisen ist - im Gegensatz zu Inseminationen zwei Tage vor der Ovulation (niedriger pH!), die mit einem höheren Anteil an weiblichen Nachkommen einhergingen.

Obgleich es KREMER (1965) und COHEN (1967) nicht möglich war, mit Kleegmanns Methode gleiche Ergebnisse zu reproduzieren, konnten dennoch BENENDO (1970) sowie GUERRERO (1970) seine Beobachtungen bestätigen.

SHETTLES berichtete schließlich 1970 in seiner Veröffentlichung "Factors Influencing Sex Ratios", daß X - und Y - Spermien aufgrund unterschiedlichem Wanderungsverhalten in saurem und basischen Milieu getrennt werden können - die Variierung des pH-Wertes die Fortbewegung und die Lebensdauer der Samenzellen beeinflusst und somit unter Verwendung alkalischer oder saurer präkonzeptioneller Zervikalspülungen das Geschlecht von Nachkommen im voraus beeinflusst werden kann, nicht zuletzt weil er den größeren X - Spermien eine bessere Resistenz gegen

die schädliche Wirkung des niederen pH-Wertes - den Y - Spermien im alkalischen Milieu aber ein größeres Fortbewegungsvermögen zusprach.

DIASIO (1971) und GLASS (1971) konnten dagegen experimentiell keine signifikante Veränderung im Verhältnis von X - zu Y - Spermien des Menschen in Lösungen verschiedener pH-Werte mit Hilfe des "F - body - Tests" nachweisen.

Der Frage der unterschiedlichen Fortbewegung von Gyno- und Androspermien nachgehend, untersuchten ROHDE et al. (1973), KAISER et al. (1974 a, b/1977), SCHILLING und THORMÄHLEN (1975), GOODALL und ROBERTS (1976), BROER (1977 a-c) sowie PORSTMANN et al. (1978) die lineare Progression von Spermien im zum Ovulationstermin bei Frauen entnommenen Zervixsekret.

Nach der horizontalen Spermienpenetration in einem (z.B. 70 x 1 x 1 mm messenden) mit Zervikalsekret gefülltem Kanal, konnte eine signifikante Anreicherung der Androspermien in der vordersten Migrationszone (Frontzone) von 53 % (BROER), 71 % (ROHDE) sowie 80 % (PORSTMANN) nachgewiesen werden.

Trotz dieses deutlichen Anreicherungs Erfolges war jedoch die Zellzahl in der Frontzone sehr gering. Dies schränkt die Möglichkeit ein, dieses Verfahren zur Anreicherung von Y - Spermien klinisch auszunutzen. Ungeachtet dieser Tatsache könnte aber auf der Basis der

progressiven Spermienbeweglichkeit ein möglicher praktischer Weg zu einer partiellen Geschlechtskontrolle zu beschreiten sein.

Dennoch scheinen die obengenannten Resultate darauf hinzudeuten, daß Y - Spermatozoen offensichtlich schneller durch ein Medium größerer Viskosität wandern.

Die Y - Spermienanreicherung wächst aber nicht proportional mit der Wegstrecke an (BROER 1977 a-c), so daß unglücklicherweise nicht die kleinere Masse des Y - Spermiums für dieses Phänomen verantwortlich gemacht werden kann.

Die erhobenen Befunde könnten trotzdem eine Erklärung für die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses der Nachkommenschaft in Abhängigkeit vom Konzeptionstermin geben, was auch schon von KAISER et al. (1974 a, b) sowie BECK et al. (1976) beschrieben und bestätigt wurde.

2.7. Filtrationsverfahren

2.7.1. Ionenaustauscherchromatographie

Nachdem seit Jahren zahlreiche Wissenschaftler Unterschiede in der Oberflächenladungsqualität von X - und Y - Spermien vermuteten (s. Kap. Galvanische Verfahren)

und eine Gewichts-differenz der beiden Typen bei menschlichen Spermatozoen von ungefähr 4 % festgestellt wurde (EVANS 1972), schien eine Beziehung der Ladungs-differenz entweder zur Masse oder zum Chromosomentyp denkbar.

Diese Hypothese zugrunde legend vermutete DOWNING 1976, daß Spermien mit unterschiedlichen Oberflächenladungscharakteristika bei der Penetration durch eine Ionenaustauschersäule unterschiedlich reagieren würden.

Die Trennung wäre von der Größe der unterschiedlichen elektrostatischen Einflüsse entscheidend abhängig, da nicht nur die passive Bewegung der Partikel durch das Fließmittel sondern auch die Wirkung der Schwerkraft auf die Masse einer elektrostatischen Wechselwirkung entgegensteht.

In seinen Untersuchungen verwendete DOWNING et al. (1976) Kationen- und Anionenaustauscher hoher, mittlerer und niederer Ionenstärke, die mit 0,5 m Phosphat-Citrat-Puffer auf einen pH von 6,0; 7,2 oder 8,0 equilibriert wurden.

Je 1 ml Spermien-suspension vom Menschen und Kaninchen wurden den Säulen aufgeschichtet und bei einer Fließgeschwindigkeit von 3 - 4 ml/min penetriert.

Die Autoren konnten jedoch mit der Ionenaustauscher-

chromatographie keine Trennung von X - und Y - Spermien erreichen. Es ließ sich lediglich die schon bekannte hohe Empfindlichkeit der Spermien gegenüber niederen pH-Werten und eine Retention toter Spermien in beiden Harztypen (Kationen-, Anionen-) feststellen.

Die Ergebnisse bestätigen eine Reihe von anderen Arbeiten, in denen mit galvanischen Verfahren aufgrund der Oberflächenladungsdifferenzen zwischen beiden Spermientypen keine Trennung von Spermien gelang oder nur als unterstützende Teilfaktoren (Convection Counter Streaming Galvanization Technique) genutzt werden konnten.

Nicht damit übereinstimmende Ergebnisse müßten somit unterschiedlicher experimenteller Genauigkeit oder möglichen speziesspezifischen Unterschieden in der Zahl und im Oberflächenladungsmuster der Spermien zugeschrieben werden.

2.7.2. Millipore - Filtrationstechnik

Dieses Verfahren stützt sich auf die Vermutung, daß sich, abgeleitet von den festgestellten Masseunterschieden (EVANS 1972), X - und Y - Spermien in ihrer Größe unterscheiden.

Dabei werden Spermiesuspensionen bestimmter Konzentrationen über ein Millipore-Filter-System filtriert, welches zuvor mit Zervikalschleim aus der ovulatorischen Phase des Oestrus auf der dem Systeminneren zugewandten Seite beschichtet wird.

Es wird davon ausgegangen, daß in dem für die Fortbewegungsfähigkeit der Spermien optimalen Medium (Zervikalschleim) und bei in ihm herrschenden physiologischem pH-Wert nur die "kleineren" Spermien aktiv die Filterporen penetrieren können.

Nach einer Inkubationszeit von ungefähr 1 Stunde in einer Feuchtkammer wird anschließend das Filtersystem mit einer Pufferlösung (z.B. PBS) durchgespült und das Filtrat ausgewertet.

Mit dieser Methode erreichte SHETTLES (1976) Erfolge bei der Trennung von Spermien des Menschen. Er berichtete von einer Anreicherung an Y - (kleine, rundliche Spermien - "F - body" - positive Spermien) Spermien bei 1000 gezählten Zellen pro Filtrat bis zu 97 %. Die Filtrate wurden von ihm fluoreszenzmikroskopisch nach BARLOW und VOSA (1970) sowie phasenkontrastmikroskopisch ausgewertet. Dabei weist er nochmals auf das von ihm schon in früheren Veröffentlichungen (s. Abschn. 2.2.1.) beschriebene Phänomen hin, daß im phasenkontrastmikroskopischen Bild morphologisch zwei Spermienpopulationen differenziert werden können - nämlich Spermien mit kleinen, rundlichen

Köpfen (Y - Spermien) und mit großen, längsovalen Köpfen (X - Spermien).

Nicht zuletzt die bei beiden mikroskopischen Auswertungsverfahren gewonnenen identischen Ergebnisse bestätigten seiner Meinung nach seine Beobachtung.

BROER et al. (1978 a, b) konnten die Ergebnisse von SHETTLES (1976) bei gleicher Versuchsanordnung nicht nachvollziehen.

Sie stellten fest, daß 5 μm die kleinste Filter-Porengröße darstellt, die von Spermien des Menschen noch penetriert werden kann. Bei Porengrößen unter 5 μm werden die Spermien bei der Passage unter Zuhilfenahme von Druck zerstört.

2.7.3. Gelfiltration

Die Methodik beruht auf der Diffusion von Partikeln durch Gel gemäß den Gesetzen der Schwerkraft.

Lineare Makromoleküle aus Dextran verbinden sich miteinander zu einem dreidimensionalen Netzwerk und bilden ein quellbares Gel.

In Korrelation zur Maschenweite des Netzwerkes verfangen sich kleinere Partikel in dem Dextranetz, während größere Partikel durch das Gel hindurchgelangen.

In dem Versuch, eine Methode zu entwickeln, mit der die Motilitätsrate von Astenozoospermien zu steigern wäre, stellten STEENO et al. (1975) nach Färbung mit QM (Quinacrine Mustard) zufällig fest, daß die ersten Fraktionen einer Sephadexgelfiltration (Sephadex G 50 fine powder, gequollen mit Locke scher Lösung, Säule $d=1,08 \text{ mm}$ - $l = 12 \text{ cm}$) minimal F-body-positiv waren. Dabei lag der "F - body - Anteil" bei $4,7 \% \pm 2,0$.

Im Jahre 1979 konnte ADIMOELJA die Ergebnisse von STEENO et al. (1975) bestätigen und die Anreicherung der X - Spermienfraktionen auf $96,0 \% \pm 2,3$ verbessern.

Auch BROER et al. (1978 a, b) weisen einen Anteil an F-body-negativen X - Spermien von 80% und eine verbesserte Motilität nach. ADIMOELJA (1979) untersuchte die Filtrate auch auf ihre Tauglichkeit für die künstliche Insemination. Dabei konnte eine Verbesserung der Spermatozoenqualität auf diese Weise insofern erzielt werden, als damit eine höhere Fertilisationsrate der Spermatozoen erreicht wurde. Man wies zwar eine Reduzierung der Spermatozoendichte durch die Filtration nach, es wurde aber dennoch eine ausreichende Konzentration für die artifizielle Insemination erreicht.

SCHILLING et al. (1978) konnten im selben Jahr jedoch keine signifikante geschlechtsspezifische Anreicherung

von X - Spermien in den ersten Fraktionen nachweisen. Ihren Beobachtungen zufolge wurden 50 - 70 % der aufgelegten Samenzellen des Menschen im Filtrat wiedergefunden. Der Rest der Spermatozoen befand sich frei im oberen Drittel der Sephadexgelsäule. Sie konnten darüberhinaus aber ebenfalls eine Erhöhung der progressiven Motilität der fraktionierten Spermien auf bis zu 95 % gegenüber 40 - 65 % in den Kontrollproben feststellen.

Auch PORSTMANN und SCHMECHTA konnten 1979 nur eine geringfügige Anreicherung menschlicher X - Spermien bis auf 69,2 % erreichen. Wurde jedoch die Eluationsgeschwindigkeit wesentlich verlangsamt und die Säulenlänge von 12 auf 25 cm erweitert, so enthielten seinen Beobachtungen zufolge schließlich alle Fraktionen weniger Androspermien.

QUINLIVAN et al. unternahmen 1982 den Versuch, die Effektivität der Trennung menschlicher Spermien mit den Verfahren nach ERICSSON et al. (1973) und STEENO et al. (1975) im direkten Vergleich zu prüfen (s. Abschnitt 2.2.5.).

Mit beiden Verfahren konnten sie eine Anreicherung der X - (74 % nach STEENO et al. 1975) sowie der Y - Spermien (74 % nach ERICSSON et al. 1973) erzielen, blieben jedoch ebenfalls deutlich unter den Werten der ersten Veröffentlichungen.

Ihrer Meinung nach ist aber eine Verbesserung der Anreicherung sowohl der X - als auch der Y - Spermienfraktionen durch eine Kombination beider Verfahren zu erreichen.

Die oben genannten theoretischen Grundlagen allein können diese Ergebnisse wohl kaum erklären. Daher muß angenommen werden, daß unbewegliche bzw. tote Spermien aufgrund mangelnder Eigenbewegung und Y - Spermien durch eine Art Adsorptionsmechanismus an den Gelpartikeln zurückgehalten werden.

Die differierenden Ergebnisse könnten, wie QUINLIVAN et al. (1982) feststellten, auf die Beobachtung zurückzuführen sein, daß bei beiden von ihnen durchgeführten Verfahren der Grad der Trennung mit den einzelnen individuellspezifischen Spermaproben variierte.

2.8. Enzymatische Verfahren

Auf der Suche nach anderen Parametern zur Bestimmung des Anteils bzw. zur Identifizierung von Y - Spermien bei Trennversuchen - was besonders für Untersuchungen mit Haussäugetierspermien wichtig wäre, da die "F - body" - Analyse hier bisher versagte - fanden STAMBAUGH und BUCKLEY (1970, 1971) eine Korrelation zwischen er-

höhtem LDH-X (Laktatdehydrogenase X) - Anteil sowie vergrößertem LDH-H/LDH-M - Quotienten und einem erhöhten Anteil an Y - Spermien innerhalb einer menschlichen Spermienpopulation. Die LDH-Werte werden elektrophoretisch bestimmt.

Im Jahre 1979 untersuchten PORSTMANN und SCHMECHTA im Zusammenhang mit einer Sedimentationsdichtegradientenzentrifugation zur Trennung menschlichen Spermienmaterials die Aussagekraft der oben beschriebenen Korrelationen der LDH-Werte.

Im Gegensatz zu den oben genannten Autoren fanden sie eine prozentuale Vermehrung der LDH-X von den Y - Spermien-reichen zu den X - Spermien-reichen Fraktionen bei völlig uncharakteristischem Verhalten des H/M-Quotienten.

Nach ihren Befunden zu urteilen, gestatten die Parameter keine Aussage über die Anreicherung von Y - Spermien.

Die beobachtete Variation der LDH-X geht ihrer Meinung nach offenbar mit der ungleichen Verteilung von Spermienbruchstücken und anderen Zellelementen auf die verschiedenen Fraktionen konform.

Zum anderen muß die Möglichkeit, daß ältere Spermien mit nachgewiesener höherer Dichte einen größeren Anteil an LDH-X enthalten, in Betracht gezogen werden.

2.9. H - Y - Antigen

2.9.1. Allgemeines

In den letzten Jahren konnte die Existenz eines spezifisch-männlichen, extrazellulären Antigens, des sogenannten "H - Y - Antigens", bei verschiedenen Spezies nachgewiesen werden (GOLDBERG et al. 1971, HESLOP 1973, KOO et al. 1973, BRANNEN 1974, HANSEN 1974, WACHTEL et al. 1974, 1975 a, b, TUNG 1975, SILVERS und WACHTEL 1977, WACHTEL 1977, KOO und GOLDBERG 1978, MÜLLER et al. 1978 a, b, OHNO und WACHTEL 1978, SILVERS et al. 1978, FLAHERTY et al. 1979, JONES et al. 1979, KRUPEN und WACHTEL 1979, MÜLLER et al. 1979, OHNO 1979, LOPO und VACQUIER 1980, MÜLLER 1980, NOERBY 1980, SHARP et al. 1980, WOLF et al. 1980, MÜLLER 1981, TUNG et al. 1982).

Obgleich die primäre, wenn nicht sogar einzige Funktion dieses Moleküls männlicher Zellmembranen für den Individualorganismus an sich, die geschlechtliche Differenzierung der Urogenaden zu sein scheint (WACHTEL et al. 1975 a, b), ist das H - Y - Antigen in normalen, männlichen Organismen als Oberflächenantigen aller Körperzellen, eingeschlossen der Erythro- und Leukozyten (WOLF

et al. 1980) sowie der Spermatozoen (GOLDBERG et al. 1971), zu finden und stellt eines der Haupthistokompatibilitätsantigene dar.

Entdeckt wurde dieses auf dem Y - Chromosom codierte Proteinmolekül zuerst bei Mäusen als ein "spezifisch dem männlichen Organismus eigenes Histokompatibilitätsantigen", welches die Abstoßung männlicher Transplantate von weiblichen Individuen desselben Inzuchtstammes verursacht (EICHWALD und SILMSER 1955). Spezifische Antiseren können durch Injektion männlicher Gewebezellen (bes. Milzzellen) in genetisch identische, weibliche Mäuse (WACHTEL 1977) oder durch mehrmalige Hauttransplantation bei weiblichen Inzuchtmäusen gewonnen werden (GOLDBERG et al. 1971, KOO et al. 1973).

Durch weitere Untersuchungen konnte schließlich nachgewiesen werden, daß dieses spezifische Antigen keine Speziesspezifität aufweist (WACHTEL et al. 1974, LOPO und VACQUIER 1980).

Als ein "Produkt" des Y - Chromosoms, welches auf der Samenzelloberfläche exprimiert wird, bot sich das H - Y - Antigen daher als Indikator an, um nachweisen zu können, ob die Struktur der Spermienoberfläche in gewisser Weise das haploide Genom reflektiert und ob somit nicht mit Hilfe serologischer Methoden X- von H - Y - Antigene tragenden Y - Spermien zu trennen sind.

Der eindeutigen Beantwortung dieser beiden Fragen waren jedoch bis heute Grenzen gesetzt.

2.9.2. Darstellung und Nachweis

Im Jahre 1971 konnten GOLDBERG et al. das H - Y - Antigen erstmals auf Mäusespermatozoen serologisch mit Hilfe des Zytotoxizitätstests in vitro nachweisen.

Dieses serologische Verfahren führt zur Lysis H - Y - Antigen positiver Zellen durch Antigen-Antikörper-Bindung (AG-AK) im Zusammenhang mit einer Komplement-bindungsreaktion. Der Anteil der von der Lysis betroffenen Zellen lag jedoch bei mehr als 50 % der Spermatozoen.

Daraus folgerte GOLDBERG, daß vermutlich nicht nur Y - Spermien, sondern auch einige X - Spermien das H - Y - Antigen in ihren Zellmembranen besitzen, was für ihn darauf hindeutete, daß viele, wenn nicht alle Komponenten der Spermienoberfläche von Vorläuferzellen früherer, prämeiotischer Differenzierungsstadien stammen könnten.

Die elektronenoptische Darstellung des H - Y - Antigens durch indirekte AG-AK-Markierung mit Tabakmosaikviren (TMV) gelang 1973 KOO et al..

Die TMV-Marker befanden sich auf den Akrosomenkappen der Mäusespermienköpfe. Obwohl eine deutliche Variation in der Anzahl der gebundenen Marker bei verschiedenen Spermien derselben Präparate festgestellt werden konnte, was zumindest einen partiellen "haploiden Effekt" andeuten könnte, ist nicht bekannt, ob nicht eine Variation gleicher Art auch in einem Versuch auftreten würde, in dem eine haploide Expression ausgeschlossen werden kann, wie bei einem autosomal - codierten Antigen, z.B. dem H-2 bei Homozygoten.

Erst kürzlich wurde ein ELISA-Test (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) zum hochempfindlichen Nachweis von H - Y - Antikörpern von MC ARTHUR und SENGUPTA (1981) in Versuchen mit Spermien und Thymozyten der Ratte entwickelt.

2.9.3. Ist eine Genexpression des haploiden Genoms in der postmeiotischen Phase der Spermatogenese existent?

Die Hoffnung, X - und Y - Spermien mit Hilfe des H - Y - Antigens immunologisch trennen zu können, stützt sich auf zwei wissenschaftlich unbewiesene, aber auch nicht eindeutig widerlegbare Thesen:

1. das H - Y - Antigen ist Ausdruck einer Genexpression des haploiden Genoms in der postmeiotischen

Phase der Spermatogenese, wonach nur Y - Chromosomen tragende Spermatiden und Spermatozoen diese spezifischen Antigene tragen.

2. H - Y - Antigene sind Produkte praemeiotischer, diploider Differenzierungsstadien der Spermatogenese oder vielmehr ihrer mit ihnen in Kontakt stehenden Ammenzellen, den Sertolizellen, die auch in der postmeiotischen Phase dem physiologischen "turn-over" unterliegen und somit nur mehr von Y - Chromosomen tragenden Samenzellen resynthetisiert werden könnten.

Demzufolge würden ausschließlich reife, epididymale Y - Spermien H - Y - Antigene tragen.

Derartige Effekte des haploiden Genoms während der Spermatogenese konnten bis heute nicht überzeugend nachgewiesen werden (BEATTY 1970, MONESI 1971, BEATTY und GLUECKSOHN-WAELSCH 1972, GEREMIA 1976, BEATTY und BIBEAU 1977, MILETTE und BELLVE 1977, MONESI 1977, D AGOSTINO et al. 1978, GEREMIA et al. 1978, MILETTE 1979, NAGAI et al. 1979, ZIPARO et al. 1980, ANDERSON et al. 1982).

Vermutlich treten solche Wirkungen nur vereinzelt auf, weil

- a) haploide Stadien der Spermatogenese eine niedrigere RNA-Syntheserate aufweisen und die Proteinsynthese

wahrscheinlich überwiegend von in gewisser Weise "konservierten" m-RNAs früherer, diploider Genomstadien gesteuert werden,

- b) die Rate des "turn-over" der Zellmembrankomponenten bei Spermien nach derzeitiger Meinung sehr langsam von statten geht, so daß das Erscheinen haploider Genomprodukte auf der Zelloberfläche keine signifikanten Änderungen im Oberflächenmuster bewirkt.

Es ist Aufgabe weiterer Untersuchungen, diese Fragestellung hinreichend zu beantworten.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methodik

3.1.1. Gewinnung der Nebenhodenspermien

Nebenhodenspermien wurden aus Nebenhoden von Bullen vom Schlachthof gewonnen. Nach dem Freipräparieren des Nebenhodens und gründlicher Reinigung mit physiologischer NaCl - Lösung wurden mit einem Skalpell zwei Inzisionen in Nebenhodenkopf und -schwanz gesetzt. Eventuell auftretende Blutungen wurden sofort abgetupft, um zur Vermeidung von Agglutinationen eine Verunreinigung der Spermienprobe mit Erythrozyten zu verhindern. Mit einer kleinen Schere und einer Pinzette wurden kleine Gewebestücke aus beiden Inzisionsbereichen des Nebenhodens gewonnen und in ein kleines selbstgefertigtes Gasesäckchen verbracht.

Dieses mit Nebenhodenparenchym gefüllte Gasesäckchen wurde in ein kleines Becherglas mit 37° C warmer PBS getaucht und das Säckende mit einem Klebestreifen am Becherrand befestigt.

Anschließend wurde der Becherglasinhalt mindestens 10 Minuten im Wärmeschrank inkubiert.

Danach wurde das Gazesäckchen aus der Lösung herausgehoben, abgetupft und verworfen. Von der so gewonnenen Nebenhodenspermen - PBS - Suspension konnte nun mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer nach der Formel

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Zellzahl(gezählt)} \times 5 \times 1000 \times \text{Verdünnung der Zellen}}{\text{gewünschte Zellzahl}}$$

eine Verdünnungsstufe von 50 Millionen Spermien/ml eingestellt werden.

3.1.2. Frischspermagewinnung

Die Frischspermagewinnung erfolgte bei Bulle, Hengst, Eber und Ziegenbock mit einer künstlichen Scheide und einem männlichen bzw. weiblichen Tier oder Phantom als Aufsprungpartner. Bei den Tieren handelte es sich um im Deckbetrieb normal beanspruchte Vatertiere.

Es wurde darauf geachtet, daß die Spermaproben einen möglichst geringen Verunreinigungsgrad aufwiesen, um Spermienagglutinationen und störende Artefaktbildungen

bei der Färbung zu vermeiden.

Die Spermaproben wurden dreimal bei 2000 g jeweils 15 Minuten zentrifugiert, wobei der Überstand nach jeder Zentrifugation verworfen und der Bodensatz erneut mit 37° C warmer PBS durch leichtes Schütteln resuspendiert wurde.

So wurden vom Seminalplasma befreite Spermien - PBS - Suspensionen erhalten, die mittels der unter Kap. 3.1.1. genannten Methode auf eine Verdünnungsstufe von 50 Millionen Spermien/ml gebracht wurden.

3.1.3. Fluoreszenzfarbstoffe

Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden zum einen Quinacrindihydrochlorid (EGA-Chemie) in 0,5 %iger wässriger Lösung (pH 7,2), zum anderen Quinacrine Mustard (Sigma) in 0,05 %iger (pH 3,5) sowie 0,005 %iger wässriger Lösung (pH 6,8) verwendet.

3.1.4. Dithiothreitol (DT),

Dithioerythritol (DE)

Zur Dekondensation des Kernchromatins standen eine 4 mM Dithiothreitol (Sigma) - n HCL - Lösung (pH 9) sowie eine 4 mM

Dithioerythritol (Sigma) - n HCL - Lösung
(pH 9) zur Verfügung.

3.1.5. Papaya - Protease (PP)

Zur Abspaltung der die Spermienmembranen
ummantelnden Sialinsäure - Protein-
klomplexe, Glyko- und Lipoproteine fand
nach B.C. BHATTACHARYA Papaya-Protease
(Sigma) Anwendung.

3.1.6. "F - body - Test "

3.1.6.1. Klassische Methode

Hierbei wurden von den vorbereiteten Spermien-
suspensionen (50 Millionen Samenzellen/ml PBS)
je 4 Objektträgerausstriche angefertigt.

Die Objektträger wurden zuvor mit Äther ent-
fettet und danach getrocknet.

Die Ausstriche wurden 2 Stunden luftgetrock-
net und anschließend 1 Stunde mit einer Metha-
nol-Eisessig-Mischung (3 : 1) fixiert.

Bei der Färbung wurden 2 Versuchsreihen ge-
bildet. So konnten nach 30-minütigem Trocknen
an der Luft von den Präparaten je 2 Aus-
striche mit Quinacrindihydrochlorid (0,5%ige
Lösung) sowie mit Quinacrine Mustard (0,05%ige

Lösung) gefärbt werden.

Die Färbezeiten betragen bei beiden Farbstoffen jeweils 5 und 10 Minuten pro Ausstrich.

Nach Ablauf der Färbezeit wurden die Objektträger dreimal in Zitronensäure-PBS-Lösung (pH 5,5) eingetaucht, anschließend mit 1-2 Tropfen der gleichen Pufferlösung eingedeckt und die Deckgläschen mit farblosem Nagellack fixiert.

3.1.6.2. Modifikation nach U.C. HEDGE (1979)

Zur Dekondensation des Kernchromatins wurde die 4 mM Dithiothreitol-Lösung (siehe Kap. 3.1.4.) zu gleichen Volumenanteilen einer vorbereiteten Spermien suspension (3 ml) zugesetzt.

Die günstigste Inkubationszeit bei Zimmertemperatur, ohne Gefahr zu laufen, daß die "Dekondensationsmischung" in einen unbrauchbaren gelatinösen Zustand übergeht, konnte in mehreren Versuchsreihen für Spermien verschiedener Spezies (Bulle, Hengst, Eber, Ziegenbock) durch Austesten verschiedener Inkubationszeiten (8, 12, 16, 20, 26 min) festgestellt werden. Nach Ermittlung der für

die jeweilige Tierart günstigsten Inkubationszeit mußte darüberhinaus noch die Zeit Berücksichtigung finden, welche notwendig war, um die Spermien durch Zentrifugation von der Dekondensationslösung abzutrennen und somit den Vorgang zeitgerecht zu unterbrechen.

Bei den untersuchten Tierspezies waren als Zentrifugationszeit 10 min bei 200 g notwendig. Diese Zeit mußte in die Gesamtkubationszeit miteinbezogen werden.

Die Fluoreszenzfärbung erfolgte auf die unter 3.1.6.1. beschriebene Weise mit 0,05%iger Quinacrine Mustard-Lösung und 5-minütiger Färbezeit, nachdem der Bodensatz nach der oben beschriebenen Zentrifugation mit 3 ml 37⁰ C warmer PBS resuspendingiert wurde.

3.1.6.3. Eigene Modifikation

a. Als weiteres Dekondensationsmittel wurde darüberhinaus noch eine 4 mM Dithioerythritol- n HCl-Lösung (pH 9) in gleicher Versuchsanordnung untersucht, wie unter 3.1.6.2. beschrieben.

b. Eine Erhöhung der Effektivität der Fluoreszenzfärbung versprach auch die Vorbehandlung der Spermien sowohl mit Papaya-Protease, als auch mit Dithiothreitol.

Um dieses Ziel zu verfolgen, wurde 1 ml einer vorbereiteten Spermiesuspension (siehe Kap. 3.1.1. und 3.1.2.) mit 5 mg Papaya-Protease 5 Minuten lang inkubiert und 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Nach dem Resuspendieren des Bodensatzes mit 3 ml 37° C warmer PBS konnten 3 ml 4 mM Dithiothreitolösung (DT) zugegeben werden.

Die Gesamtinkubationszeit, welche eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 200 g einschloß, richtete sich nach den bei Kap. 3.1.6.2. für die verschiedenen Spermiespezies gewonnenen Ergebnisse (siehe Kap. 4.1.2.).

Nach Resuspension des Bodensatzes mit 1 ml 37° C warmer PBS wurde die Fluoreszenzfärbung, wie bei Kap. 3.1.6.2. beschrieben, durchgeführt.

3.1.7. " B - body - Test "

3.1.7.1. Klassische Methode (BHATTACHARYA 1976)

Nach BHATTACHARYA wird 1 ml Sperma (ca. 50 Millionen Samenzellen) mit einer Elektrolytlösung dreimal bei 2500 g 15 Minuten lang zentrifugiert.

Anschließend resuspendiert man das Sediment mit 1 ml frischer Elektrolytlösung und mischt 3 Tropfen dieser Suspension mit 5 mg Papaya-Protease.

Nach einer Digestionszeit von ungefähr 10 Minuten bei Raumtemperatur wird ein Tropfen Digestionslösung mit einem Tropfen 0,005%-iger Quinacrine Mustard-Lösung gemischt, auf einen Objektträger aufgetragen, ausgestrichen und eingedeckt.

Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung erfolgt nach einer Färbezeit von 40 Minuten. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nach Vorbereitung der Spermienlösungen (wie unter 3.1.2. beschrieben) in gleicher Weise verfahren.

Um jedoch festzustellen, inwieweit die Einwirkungszeit der Papaya-Protease auf die Samenzellen verschiedener Tierspezies die

Fluoreszenzintensität beeinflusst, wurden 4 Versuchsreihen mit Digestionszeiten von 5, 10, 15 und 20 Minuten angesetzt.

3.1.7.2. Eigene Modifikation

Eine Hoffnung, die Effizienz des "B - body - Testes" steigern zu können, lag in der Kombination der "Digestionsmethode" mit der "Dekondensationsmethode".

Dazu wurden die Spermien-Papaya-Protease-Suspensionen (50 Millionen Spermien in 1 ml PBS und 5 mg Papaya-Protease) nach Abschluß des Digestionsvorganges 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Spermis sediment mit 1 ml 4 mM Dithiothreitol-Lösung unter leichtem Schütteln resuspendiert.

Anschließend erfolgte eine Inkubation von ca. 10 Minuten im Wärmeschrank bei 37° C. Dieser Suspension wurde ein Tropfen entnommen und die Färbung, wie unter 3.1.7.1. beschrieben, durchgeführt.

3.1.8. Fluoreszenzmikroskopie

Die gefärbten Präparate wurden binnen einer

Stunde mit einem Leitz-Dialux 20-Fluoreszenzmikroskop (Leitz Filterblock E 2 - Anregungsbereich Blau -) ausgewertet und geeignete Präparatausschnitte zur Dokumentation fotografiert (1600 ASA Farbnegativ-Film).

Der Auswertung lag

1. eine Beurteilung der Fluoreszenzintensität der Spermien im Bereich von Kopf, Akrosom, Hals, Mittelstück, Schwanz,
2. der Prozentsatz der bei 300 ausgewählten Spermien pro Präparat zu beobachtenden "F - bzw. B - bodies" und
3. das Festhalten von unmittelbar mit den Verfahren in Verbindung stehenden Veränderungen am Spermium selbst zugrunde.

4. Ergebnisse

4.1. "F - body - Test"

4.1.1. Klassische Methode

Am Färbeverhalten der Spermien der untersuchten Tierspezies konnten sowohl mit Quinacrindihydrochlorid als auch mit Quinacrine Mustard keine individuellen Unterschiede innerhalb der Spezies festgestellt werden.

Gleiches gilt für den Vergleich von Nebenhodenspermien mit ejakulierten Spermien beim Rind. Auch hier zeigte sich weder eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität, noch eine besondere, abweichende Kontrastierung der Samenzellen, so daß im weiteren nur noch Spermien aus Ejakulaten untersucht wurden.

Das Färbeverhalten der beiden Farbstofflösungen erwies sich als recht unterschiedlich:

Quinacrindihydrochlorid (QH) ließ nach einer Färbezeit von 5 Minuten bei fast allen untersuchten Haussäugetieren nur eine schwache

Färbung erkennen, so daß diese Präparate selbst wenige Minuten nach der Färbung nicht mehr auszuwerten waren.

In geringem Maße machten hier Eberspermien eine Ausnahme. Sie nahmen den Farbstoff, wie auch bei Färbungen mit Quinacrine Mustard auffiel, leichter auf und fluoreszierten somit intensiver.

Wurde jedoch die Färbezeit auf 10 Minuten ausgedehnt, so wiesen Kopf, Hals und Mittelstück eine bessere Fluoreszenz auf und die Präparate konnten wenige Minuten nach der Färbung noch ausgewertet werden (Tabelle 1). Mit Quinacrine Mustard (QM) hingegen erhielt man bei 5-minütiger Färbung Farbtintensitäten von gering bis sehr gut, was eine gute Kontrastierung mit sich brachte.

Diese für die Beurteilung der Präparate so wichtige Kontrastbildung ging aufgrund diffuser, starker Fluoreszenz bei einer Färbezeit von 10 Minuten fast gänzlich verloren (Tabelle 2).

Die Absicht, kontrastreiche Präparate mit dennoch guter Fluoreszenz zu erhalten, um heller fluoreszierende Punkte ("F - bodies") erkennen zu können, ließ sich diesen Ergeb-

Tierart	Färbezeit in Minuten	FLUORESZENZINTENSITÄT Kopf Akrosom Hals Mittel- Schwanz stück				"F-bodies" in % bei 300 ausgezählten Zellen	Bemerkungen
Bulle	5	0	0	0	0	0	schwache Fluoreszenz, nicht auswertbar
	10	+	0	+	+	0	bis 10 Minuten nach der Färbung noch auswertbar
Hengst	5	0	0	0	0	0	siehe Bulle
	10	+	0	0	+	0	bis 15 Minuten nach der Färbung noch auswertbar
Eber	5	+	0	0	+	0	bis 10 Minuten nach der Färbung noch auswertbar
	10	0	++	++	+	0	bis 25 Minuten nach der Färbung noch auswertbar
Ziegenbock	5	0	0	0	0	0	siehe Bulle
	10	+	0	+	0	0	bis 10 Minuten nach der Färbung noch auswertbar

Tabelle 1: Beurteilung der Fluoreszenzintensität von nach der klassischen Methode des "F-body-Tests" mit Quinacridindihydrochlorid (QH) 5 bzw. 10 Minuten lang gefärbten Präparaten
o gering + mäßig ++ gut +++ sehr gut

Tierart	Färbezeit in Minuten	FLUORESZENZINTENSITÄT				"F-bodies" in % bei 300 ausgezählten Zellen	Bemerkungen
Bulle	5	++	0	+++	+	0	guter Kontrast
	10	+++	++	+++	+++	+	starke Fluoreszenz der ganzen Zelle, schlech- ter Kontrast
Hengst	5	++	0	+++	++	0	siehe Bulle
	10	+++	++	+++	+++	++	siehe Bulle
Eber	5	+++	0	+++	++	0	siehe Bulle
	10	+++	++	+++	+++	+++	siehe Bulle
Ziegenbock	5	++	0	+++	+	0	siehe Bulle
	10	+++	++	+++	+++	+	siehe Bulle

Tabelle 2: Beurteilung der Fluoreszenzintensität von nach der Klassischen Methode des "F-body-Tests" mit Quinacrine Mustard (QM) 5 bzw. 10 min lang gefärbten Präparaten
 0 gering + mäßig ++ gut +++ sehr gut

nissen zufolge am besten mit Quinacrine Mustard und einer Färbezeit von 5 Minuten erreichen.

Dennoch konnten in keinem Falle "F - bodies" nachgewiesen werden (Abb. 1 - 5).

4.1.2. Modifikation nach U.C. HEDGE (1979)

Die Behandlung der hier untersuchten Haus-säugetierspermien mit Dithiothreitollösung führte, wie dies auch von menschlichen Spermien bekannt ist, zum Quellen der ganzen Samenzelle. Davon war der Kopfbereich besonders betroffen, der seine Form vor allem bei Hengst- und Eberspermien deutlich veränderte.

Als optimale Inkubationszeiten ließen sich bei Samenzellen von Bulle, Hengst, Eber und Ziegenbock voneinander abweichende Werte bestimmen, die zum einen eine günstige Viskosität der Dekondensationssuspensionen gewährleisten, zum anderen störende Agglutinatbildungen im Spermienausstrich vermeiden halfen.

Individuelle Unterschiede innerhalb der Tierart kamen nicht zur Beobachtung, so daß

sich Gesamtinkubationszeiten für den Bullen von 20 Minuten, für den Hengst von 26 Minuten, für den Eber von 12 Minuten und für den Ziegenbock von 16 Minuten ergaben (Tabelle 3). Daraus errechneten sich die Ruheinkubationszeiten als eine Differenz aus Gesamtinkubationszeit und Zentrifugationsinkubationszeit (10 Minuten).

Neben einer geringgradigen Verbesserung der Fluoreszenzintensität ohne Verlust der Kontrastgebung, konnten bei den untersuchten Tierspezies in unterschiedlicher Häufigkeit von ca. 4 - 10% bei 300 ausgezählten Zellen in der Literatur als "F - bodies" beschriebene, scharf umschriebene kreisrunde, deutlich heller fluoreszierende Punkte im postakrosomalen Kopfbereich nachgewiesen werden (Abb. 6 und 7).

Darüberhinaus ließ sich vor allem beim Eber, angedeutet aber auch beim Hengst, die Akrosomenkappe darstellen. Ebenso ließen sich bei diesen Tierarten die Mittelstücke sehr gut anfärben und waren dadurch sehr gut von den anderen Spermienabschnitten abgrenzbar (Tabelle 5, Abb. 6, 7 und 8).

Viskosität der Dekondensationssuspensionen bei mehreren Haussäugertieren nach verschiedenen Inkubationszeiten bei Raumtemperatur und daraus resultierende, störende Agglutinatbildungen im Spermienausstrich.

Tabelle 3: Behandlung mit Dithiothreitollösung

Agglutinat- bildungen nach	Tierart	8 min	12 min	16 min	20 min	26 min
26 min	Bulle	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	teils gelatinös
30 min	Hengst	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig
16 min	Eber	flüssig	flüssig	teils gelatinös	gelatinös	gelatinös
20 min	Ziegenbock	flüssig	flüssig	teils gelatinös	gelatinös	gelatinös

Tabelle 4: Behandlung mit Dithioerythritollösung

Agglutinat- bildungen nach	Tierart	8 min	12 min	16 min	20 min	26 min
16 min	Bulle	flüssig	flüssig	teils gelatinös	teils gelatinös	gelatinös
20 min	Hengst	flüssig	flüssig	flüssig	teils gelatinös	teils gelatinös
12 min	Eber	flüssig	flüssig	teils gelatinös	gelatinös	gelatinös
16 min	Ziegenbock	flüssig	flüssig	teils gelatinös	gelatinös	gelatinös

Tierart	FLUORESZENZINTENSITÄT				"F-bodies" in % bei 300 ausgezählten Zellen	Bemerkungen
	Kopf	Akrosom	Hals	Mittel- stück	Schwanz	
Bulle	+	o	++	+	+	-
Hengst	+	+	+	+++	+	Akrosomenkappe schemenhaft erkennbar
Eber	++	++	+	+++	+	Akrosomenkappe deutlich sichtbar
Ziegenbock	+	o	++	+	+	-

Tabelle 5 : Beurteilung der Fluoreszenzintensität von nach HEDGE et al. (1979) mit Dithiothreitollösung behandelten und anschließend mit 0,05 %-iger Quinacrine Mustard - Lösung 5 Minuten lang gefärbten Spermien verschiedener Haussäugetiere.

o gering + mäßig ++ gut +++ sehr gut

4.1.3. Eigene Modifikation

- a. Das Quellen der Spermien ließ sich auch bei der Behandlung mit einer Dithioerythritollösung, wie auch im Kapitel 4.1.2. beschrieben, nicht vermeiden (Abb. 9).

Die optimalen Inkubationszeiten waren jedoch deutlich kürzer und damit mit dem Handicap verbunden, im Bereich der Zentrifugationsinkubationszeit einen zu geringen Spielraum zu gewährleisten.

Bei Gesamtinkubationszeiten von 12 Minuten beim Bullen, 16 Minuten beim Hengst, 8 Minuten beim Eber und 12 Minuten beim Ziegenbock wird die Ruheinkubationszeit bei einer für die Samenzellen schonenden Zentrifugationsinkubation von 10 Minuten immer kürzer (Tabelle 4).

Die Fluoreszenzintensität fiel durchweg schlechter aus als dies bei der Dithiothreitolbehandlung der Fall war. Die Mittelstücke waren in keinem Fall fluoreszenzoptisch hervorgehoben. Die Akrosomenkappe stellte sich nur selten dar. Am

häufigsten war sie vor allem bei Hengst-spermien angedeutet (Abb. 10).

"F - bodies" waren in keinem der Präparate zu beobachten.

- b. Die Behandlung der Spermien mit Papaya-Protease und Dithiothreitollösung war eine sehr gut durchführbare Methode, mit der von allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verfahren die einzelnen Spermienabschnitte, Kopf, Hals, Mittelstück und Schwanz, am besten dargestellt und voneinander abgegrenzt werden konnten (Abb. 11 und 12).

Dieses Phänomen ließ sich bei allen hier untersuchten Haussäugetierspezies gleichermaßen beobachten. Dennoch konnten auch nach diesem Verfahren keine "F - bodies" dargestellt werden.

4.2."B - body - Test"

4.2.1. Klassische Methode

Das beim "B - body - Test" angewandte Färbefahren war einfach durchführbar und

weitaus weniger zeitintensiv als das Verfahren beim "F - body - Test".

Die Färbung zeichnete sich im allgemeinen im Vergleich zu den vorher beschriebenen Methoden durch eine gleichmäßigere Fluoreszenzintensität über die ganze Zelle hinweg aus. Der Nachteil bestand in einer fast kontrastlosen Färbung, in der einzelne Samenzellenabschnitte kaum differenziert werden konnten.

Auffallend hingegen waren kreisrunde, scharf umschriebene, heller fluoreszierende Punkte im postakrosomalen Zellabschnitt (Abb. 14, 15, 16, 17 und 18), wie dies auch schon beim "F - body - Test" in der Modifikation nach U.C. HEDGE (1979) an gleicher Stelle zur Beobachtung kam. Diese vermeintlichen "B - bodies" konnten geringgradig häufiger vorgefunden werden, wie dies beim oben genannten "F - body - Test" zu beobachten war (siehe Kap. 4.1.2.).

Aber auch die Fluoreszenzintensität selbst variierte tierartlich unterschiedlich (Tabelle 7).

So wiesen Bullen- und Ziegenbockspermien ab einer Inkubationszeit von 15 Minuten eine sehr intensive Färbung auf.

Dies konnte bei Eberspermien schon ab 10 Minuten, bei Hengstpermien jedoch erst ab 20 Minuten erreicht werden.

Trotzdem sollten die oben genannten Inkubationszeiten bei den hier untersuchten Tierarten nicht um mehr als 5 Minuten überschritten werden, da ansonsten vor allem die Spermienkopfoberfläche blasige Auftreibungen zeigt, welche sich deutlich anfärben lassen (Abb. 13).

Darüberhinaus war jedoch eine mit Zunahme der Inkubationszeit ebenfalls zunehmende Vesikelbildung von zuvor weitgehend verunreinigungsfreien Spermien suspensionen (u.a. Abb. 14, 16 und 18) auffallend.

Diese Vesikel hatten zum größten Teil eine den oben beschriebenen "B - bodies" sehr ähnliche Form und Fluoreszenz.

Tierart	5	10	15	20
Bulle	o	+	+++	+++
Hengst	o	++	++	+++
Eber	++	+++	+++	+++
Ziegenbock	o	++	+++	+++

Tabelle 6 : Fluoreszenzintensität beim "B-body-Test"
bei Haussäugetierspermien nach verschiedenen Digestionszeiten mit Papaya-Protease
bei Raumtemperatur.

o gering + mäßig ++ gut +++ sehr gut

"B-body-Test" Klassische Methode	Tierart	"B-body-Test" Eigene Modifikation
8,2 - 9,7 %	Bulle	9,8 - 13,2 %
7,0 - 8,4 %	Hengst	8,5 - 11,3 %
6,1 - 6,9 %	Eber	6,7 - 7,2 %
4,5 - 5,3 %	Ziegenbock	4,9 - 6,1 %

Tabelle 7 : Prozentuale Häufigkeit der beobachteten
"B-bodies" von 300 ausgezählten Spermien
pro Präparat bei beiden hier durchgeführten
"B-body-Tests".

4.2.2. Eigene Modifikation

Die Kombination des "B - body - Testes" nach BHATTACHARYA mit einer Dithiothreitolbehandlung kam im Hinblick auf die Fluoreszenzintensität und Kontrastierung der Klassischen Methode gleich, zumal auch hier keine tierartlichen Besonderheiten zu beobachten waren.

Die artifizielle Vesikelbildung war weitaus geringer als beim "B - body - Test" und die prozentuale Häufigkeit vermeintlicher "B - bodies" im Präparat nahm zudem noch etwas zu (Tabelle 7 und Abb. 20, 21, 22 und 23).

5. Diskussion

Der "F - body - Test", nach BARLOW und VOSA (1970), gilt derzeit als die anerkannteste Methode, mit der die Effizienz der Verfahren zur Trennung von menschlichen X - und Y - Spermien beurteilt werden kann. Es ist jedoch bisher nicht gelungen (SUMNER et al. 1971), die "F - bodies" bei Haussäugetieren darzustellen.

Erst B.C. BHATTACHARYA et al. (1976) konnten eine neue Fluoreszenzfärbetechnik - den "B - body - Test" entwickeln, mit der sie in der Lage waren, auch Y - Spermien von Pferd und Rind darzustellen.

Die prozentuale Häufigkeit der "B - bodies" in den Ausstrichen lag beim Bullen bei 49,8 % und beim Hengst bei 47,3 %. Diese Werte kommen dem theoretisch zu erwartenden 50 % - Anteil an der Gesamtpopulation der Spermien sehr nahe, was vor allem deshalb überrascht, weil wir vom "F - body - Test" wissen (BARLOW und VOSA 1970, ELLISON und BARR 1972, WEISBLUM und DE HASETH 1972/1973), daß der damit nachzuweisende Anteil an Y - Spermien pro Ausstrich ca. 10 % unter diesem 50 % - Wert liegt und auch durch die verfeinerte Methodik nach U.C. HEDGE (1979) eine Verbesserung der Auswertungsgenauigkeit nur um ungefähr 3 % erreicht werden konnte.

Die Fragen aber, warum der 50 % - Wert der Y - Spermienpopu-

lation beim Menschen mit dem "F - body - Test" nicht erreicht werden kann und warum bei Haussäugetieren keine "F - bodies" darzustellen sind, blieben bis heute ungeklärt.

Gründe hierfür sieht man

1. im schnellen Verblassen der Fluoreszenz
2. in einer gelegentlich mäßigen Aufnahme des Farbstoffes, welche die Deutlichkeit der "F - bodies" herabsetzt,
3. in der möglichen Unzugänglichkeit des Y - Chromosoms für die Quinacrinfarbstofflösung, wenn das Chromosom sich im innersten Teil des sehr kompakten Kernchromatins befindet, zumal auch eine Dekondensation mit Dithiothreitol (U.C. HEDGE 1979) kaum vollständig erreicht werden kann, ohne die Dekondensationssuspension (Spermien - DT - Suspension) in einen gelatinösen, unbrauchbaren Zustand überzuführen und
4. im Fehlen des typischen Bandenmusters bei den Haussäugetieren, welches durch die Kombination der Basengehaltvarianz und dem Typus der Basenwiederholungen die Fluoreszenzqualität des "F - body's" ausmacht (SELANDER 1973, DE LA CHAPELLE 1973).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit ermutigen nicht dazu, das Problem als gelöst zu betrachten. Dennoch unterstüt-

zen sie die Feststellungen anderer Autoren (u.a. SUMNER et al. 1971/1976), daß die Fluoreszenzfärbung mit Quinacrine Mustard zur Differenzierung der X - und Y - Populationen einer Spermaprobe beim Haussäugetier keine oder zumindest keine zuverlässigen Ergebnisse erbringt.

In nach der klassischen Methode des "F - body - Tests" mit Quinacrindihydrochloridlösung bzw. Quinacrine Mustard-Lösung gefärbten Spermienpräparaten konnten in keinem Falle "F - bodies" nachgewiesen werden. Quinacrindihydrochlorid zeigte im Vergleich mit Quinacrine Mustard ein bedeutend schlechteres Penetrationsvermögen in die Zellen und eine sehr schnell verblassende Fluoreszenz. Daher konnten diese Präparate nur kurze Zeit nach der Färbung ausgewertet werden. Nach den Berichten von BARLOW und VOSA verhielten sich Humanspermien anders. Hier verblaßte die Fluoreszenz von Quinacrindihydrochlorid zwar nicht so schnell wie bei Quinacrine Mustard, aber es traten bei Spermien desselben Spenders weniger "F - bodies" auf.

Eberspermien nahmen beide Quinacrinfarbstoffe besser auf als Bullen- und Hengstspermien, woraus man schließen könnte, daß deren extrazelluläre Hüllsubstanzen sowie auch deren Zellmembranen einen geringeren Penetrationswiderstand für die Farbstoffe aufweisen.

Auch bei der Modifikation nach HEDGE (1979) ließen sich individuelle Empfindlichkeiten von Spermien verschiedener

Spezies gegenüber der Dekondensation mit Dithiothreitol-lösung und Dithioerythritollösung feststellen. So lag die optimale Inkubationszeit der Dekondensation mit Dithiothreitol bei Spermien vom Menschen (HEDGE 1979) und beim Bullen bei 20 Minuten, beim Hengst bei 26 Minuten, beim Eber bei 12 Minuten und beim Ziegenbock bei 16 Minuten. Diese speziesspezifischen Empfindlichkeiten gegenüber einer Behandlung in vitro kamen auch bei der Digestion mit Papaya - Protease zur Beobachtung.

Bei Dithioerythritol als Dekondensationsmittel fiel die Fluoreszenzintensität durchweg schlechter aus. Zudem fielen die speziesspezifisch am besten geeigneten Inkubationszeiten deutlich kürzer aus, so daß eine schonende Zentrifugation zum Abbruch der Dekondensationsreaktion kaum mehr möglich war.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Morphologie der Spermien erwies sich der "F - body - Test" nach Behandlung mit Papaya - Protease und Dithiothreitol-lösung durch eine sehr gute Kontrastgebung bei der Färbung als besonders geeignet.

Bei diesem Verfahren scheinen Digestion und Dekondensation unterschiedliche Angriffspunkte in den Abschnitten Kopf, Hals, Mittelstück und Schwanz zu finden, woraus sich für den Farbstoff verschieden gute Penetrationsmöglichkeiten

ergeben, die in unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten zum Ausdruck kommen.

Gleiches konnte beim "B - body - Test" nach gleicher Behandlung nicht festgestellt werden. Offenbar ist es mit der dabei verwendeten, um eine Zehnerpotenz weniger konzentrierten Quinacrine Mustard - Lösung nicht möglich, eine ähnliche Kontrastgebung zu schaffen. Obgleich es allerdings kaum wünschenswert erscheint, zur Darstellung (Abgrenzung und Hervorhebung) von "B - bodies" eine allzu intensive, diffuse Färbung der Spermienköpfe zu erzielen.

Die Digestionsmethode mit Papaya - Protease ist nach der Klassischen Methode des "B - body - Tests", wie oben schon angesprochen, ebenso in der Lage, die Penetrationsfähigkeit der extrazellulären Hüllsubstanzen sowie der Zellmembranen für den Fluoreszenzfarbstoff zu erleichtern.

Diese erfordert allerdings bei den verschiedenen Haussäugetieren aufgrund unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber der Digestion unterschiedliche Inkubationszeiten.

Im Unterschied zu BHATTACHARYA (1976), der bei Rind und Pferd ca. 10 Minuten inkubierte, konnten in dieser Arbeit die optimalen Inkubationszeiten für Bullenspermien mit 15 Minuten, für Hengstpermien mit 20 Minuten, bei Eberspermien mit 10 Minuten und bei Ziegenbockpermien mit 15 Minuten ermittelt werden.

Sowohl beim "F - body - Test" in der Modifikation nach HEDGE (1979), als auch bei beiden in dieser Arbeit durchgeführten "B - body - Test" - Verfahren ließen sich, wie schon von BARLOW und VOSA (1970) erwähnt, scharf umschriebene, hellere, runde Punkte, die gewöhnlich am akrosomalen Ende des Kernes lokalisiert waren (PEARSON et al. 1970 a, b, 1971, PEARSON 1972), in den Präparaten beobachten (siehe Abb. 6, 7, 14, 15, 16, 17 und 18).

Der Prozentsatz, in dem solche "F - und B - bodies" auftraten, war tierartlich unterschiedlich und von der entsprechenden Methodik abhängig. Die Häufigkeit insgesamt lag allerdings mit Werten zwischen ca. 4 - 10 % weit von den zu erwartenden 50 % entfernt.

Das gelegentliche Auftreten von zwei oder mehreren leuchtenden Punkten in einem Spermium, welche in wenigen Fällen auch im Mittelstück zu sehen waren sowie das Auftreten ähnlich gestalteter, fluoreszierender Punkte im extrazellulären Bereich der Spermienausstriche bei der klassischen Methode des "B - body - Tests" (Abb. 14, 16 und 18) stellte eine spezifische Darstellung des Y - Chromosoms in Spermien der Haussäugetiere in Frage.

Auffallend war, daß diese Punkte nur bei Verfahren auftraten, bei denen die Spermien in vitro dekontensiert,

angedaut oder sowohl digestiert als auch dekontensiert wurden. Dies läßt den Schluß zu, daß zum einen beim Andauen der Zellwand mit Papaya - Protease, zum anderen auch bei der Dekontensation des Kernchromatins strukturelle Umbauvorgänge am Spermium von statten gehen, die zur Bildung von intra- und extrazellulären Vesikeln führen (siehe Abb. 13).

Diese vesikulären Artefakte treten als kreisrunde, scharfumschriebene, fluoreszierende Punkte vor allem im postakrosomalen Kopfabchnitt auf. Es ist anzunehmen, daß solche Punkte im Bereich des Akrosoms durch dessen Eigenfluoreszenz verdeckt sind oder die Dekontensationssubstanzen innerhalb der Inkubationszeit nicht bis in den subakrosomalen Kernbereich vordringen können.

Beim "B - body - Test" eigener Modifikation traten weit weniger extrazelluläre, vesikuläre Verunreinigungen auf, was vermutlich auf die Zentrifugation nach der Digestion zurückzuführen ist.

Abschließend kann festgestellt werden, daß die Färbung mit Quinacrindihydrochlorid und Quinacrine Mustard zur Darstellung von Y - Chromosomen bei Haussäugetieren nicht geeignet ist.

Dieses Ergebnis schuf leider nicht die Voraussetzungen, um Versuche zur Trennung von X - und Y - Haussäugetier-

spermien unternehmen zu können.

Betrachtet man jedoch die Literatur, so kann festgestellt werden, daß es mit mehreren Verfahren wie der Dichtegradientensedimentation (ROBERTS 1972, BROER 1978 b, QUINLIVAN et al. 1982), der Gelfiltration (STEENO et al. 1975, SHETTLES 1976, ADIMOELJA 1978, BROER 1978 a, QUINLIVAN et al. 1982), der progressiven Motilität der Spermien im Cervikalschleim (ROHDE 1973, BROER 1977 a-c, PORSTMANN et al. 1978) und dem Convection Counter Streaming Sedimentation Galvanization Technique (CCSSGT) nach BHATTACHARYA (1979) gelungen ist, sowohl X - als auch Y - Spermienpopulationen auf Werte von ca. 80 - 90 % anzureichern.

Diese mit diesen Verfahren erzielten hervorragenden Ergebnisse gelangen aber vor allem mit Spermien vom Menschen. Das schlechte Versuchsergebnis bei Haussäugetieren ist darauf zurückzuführen, daß bis heute kein probates Verfahren vorhanden ist, das Y - Chromosomen eindeutig darzustellen.

Versuche, Y - Spermien mit Hilfe eines spezifischen, bei allen männlichen Säugetierzellen, also auch bei Spermien, vorkommenden, extrazellulären Antigens, des H - Y - Antigens, welches nur auf dem Y - Chromosom codiert ist, durch spezifische Antikörper abtrennen zu können, schlugen jedoch bisher fehl.

Vermutlich tritt eine haploide Genexpression in der Spermiogenese nur vereinzelt auf, weil

- a. haploide Stadien der Spermatogenese eine niedrigere RNA - Syntheserate aufweisen,
- b. Samenzellen von den Sertolizellen gebildete und aus früheren diploiden Genomstadien übernommene m - RNA s "konserviert" haben und
- c. die Rate des "turn-over" der Zellmembrankomponenten bei Spermien sehr langsam von statten geht, so daß haploide Genprodukte auf der Zelloberfläche keine signifikanten Änderungen im Oberflächenmuster bewirken.

Dennoch dürfte dem Gebiet der Immunologie des Spermiums im Hinblick auf eine vollständige Trennung von X - und Y - Spermien mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers die Zukunft gehören.

6. Zusammenfassung

Nach einem ausführlichen Überblick über die Literatur (von ihren Ursprüngen bis heute) zum Thema der Darstellung und Trennung von X - und Y - Säugerspermatozoen wurden in eigenen Untersuchungen aus der Humanmedizin bekannte fluoreszenzmikroskopische Differenzierungsmethoden bei Haussäugetieren geprüft.

Untersucht wurden Spermien von Rind, Pferd, Schwein und Ziege. Bei Färbung mit Quinacrindihydrochlorid und Quinacrine Mustard konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich Penetrationsvermögen und Fluoreszenzintensität festgestellt werden.

Der "F - body - Test" nach BARLOW und VOSA (1970) verlief bei Spermien der vier untersuchten Spezies auch nach Modifikation des Verfahrens negativ. Durch Modifikation des "F - body - Tests" nach HEDGE (1979), mit dem "B - body - Test" nach BHATTACHARYA (1976) sowie eigener Modifikation konnten umschriebene, runde, heller fluoreszierende Punkte ("F - bzw. B - bodies") im postakrosomalen Kopfbereich bei bis zu ca. 10 % der Spermien beobachtet werden.

Nach den vorliegenden Ergebnissen muß die Möglichkeit, bei Haussäugetieren Y - Spermien fluoreszenzmikroskopisch einwandfrei darzustellen, wie es von BHATTACHARYA (1976) berichtet wurde, bestritten werden.

Da derzeit auch keine anderen Verfahren zur Unterscheidung von Gyno- und Androspermien der Haussäugetiere vorliegen, ist auch eine Trennung in X - und Y - Populationen nicht möglich.

Eine Weiterentwicklung könnte vor allem mit immunologischen Verfahren gelingen, um mit Hilfe spezifischer Antikörper eine vollständige Trennung von Gyno- und Androspermien zu erreichen.

7. Summary

With respect to the subject of representing and separating X and Y bearing sperms with domestic mammals;

Literature study and tests for differentiating X and Y sperms by fluorescence microscopy.

After a detailed review of the literature (starting with its origins up to today) as regards the subject of illustrating and separating X- and Y mammal spermatozoa, the applicability of fluorescence-microscopic differentiating methods known from human medicine was tested by the author's with domestic mammals.

Sperms of cattle, horse, pig and goat were examined. Distinct differences were found as regards the penetration and fluorescence intensity after coloring with quinacrine dihydrochloride and quinacrine mustard.

The "F - body - test" according to BARLOW and VOSA (1970) showed negative results with the sperms of the four tested species even after modifying the method. A modification of the "F - body - test" according to HEDGE et al. (1979), with the "B - body - test" according to BHATTACHARYA (1976) and the author's own modification made it possible to observe circumscribed, round, brighter fluorescent dots ("F - and B - bodies, respectively") in the postacrosomic head area, in up to about 10 % of the sperms.

In view of the results obtained the possibility of a distinct fluorescence-microscopic representation of Y sperms in domestic mammals, as it was reported by BHATTACHARYA (1976), has to be contested.

No other methods being available at presents to differentiate X- and Y bearing sperms of domestic mammals, it is thus not possible to seperate the sperms into X- and Y-populations.

A further progress could be made especially with immunological methods using specific antibodies for obtaining a complete separation of X- and Y bearing spermatozoa.

8. Anhang : Abbildungen

In den Legenden verwendete Abkürzungen:

QH Quinacrindihydrochlorid gefärbt

QM Quinacrine Mustard gefärbt

DT Dithiothreitol behandelt

DE Dithioerythritol behandelt

PP Papaya - Protease behandelt

450 x 450 - fache Vergrößerung

(5¹) 5 Minuten gefärbt bzw.
5 Minuten inkubiert



Bild 1 : Nebenhodenspermien (Bulle), "F-body-Test",
QH (10'), 1000 x



Bild 2 : Bulle, "F-body-Test", QM (5'), 1000 x

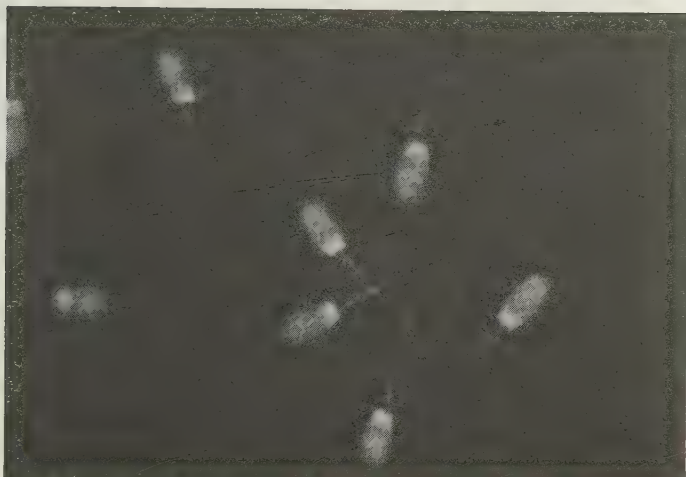


Bild 3 : Hengst, "F-body-Test", QM (5'), 1000 x

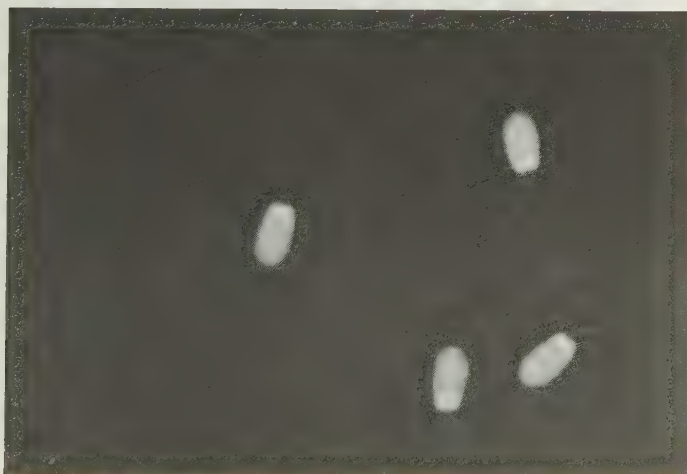


Bild 4 : Eber, "F-body-Test", QM (5'), 1250 x



Bild 5 : Ziegenbock, "F-body-Test", QM (5'), 450 x



Bild 6 : Bulle, Methode nach U.C. HEDGE (1979), QM (5'), 1250 x

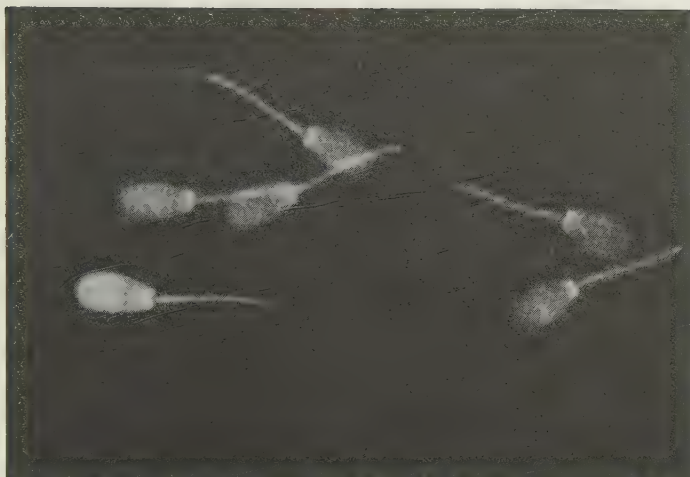


Bild 7 : Hengst, Methode nach U.C. HEDGE (1979), QM (5'), 1000 x

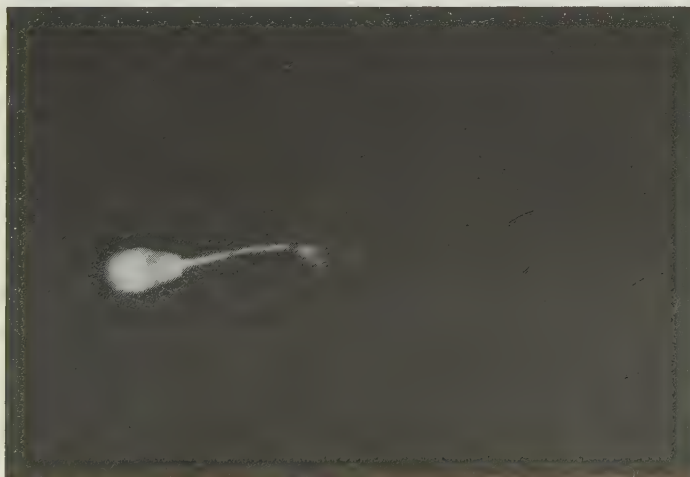


Bild 8 : Eber, Methode nach U.C. HEDGE (1979), QM (5'), 1000 x

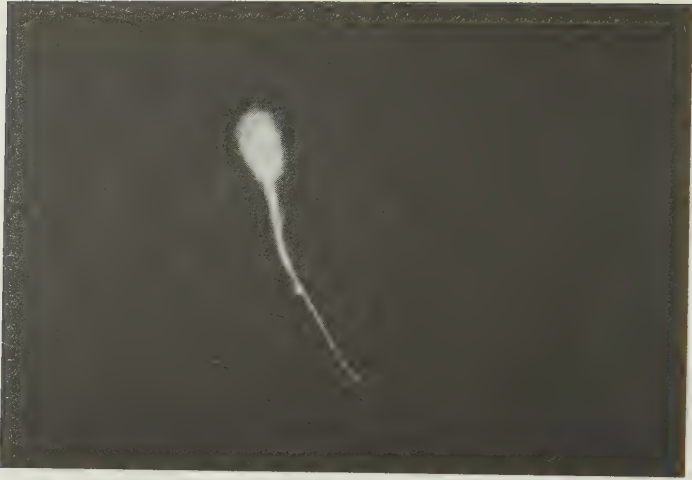


Bild 9 : Eber, "F-body-Test", DE (12'), QM (5'), 1000 x



Bild 10 : Hengst, "F-body-Test", DE (16'), QM (5'), 1250 x

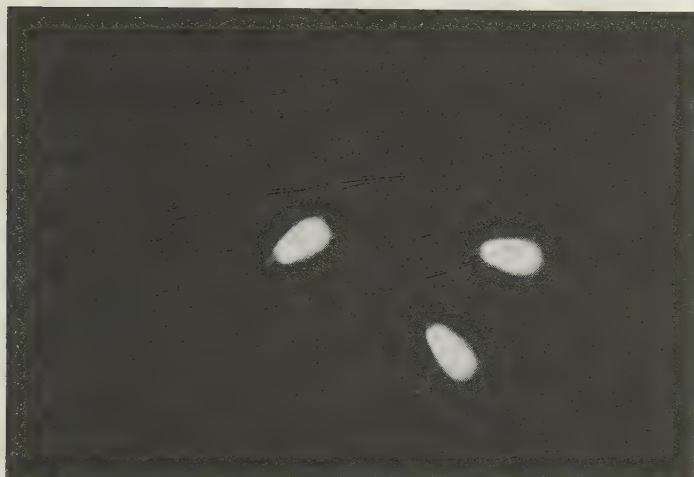


Bild 11 : Bulle, "F-body-Test", PP und DT behandelt,
QM (5'), 1000 x



Bild 12 : Hengst, "F-body-Test", PP und DT behandelt,
QM (5'), 450 x

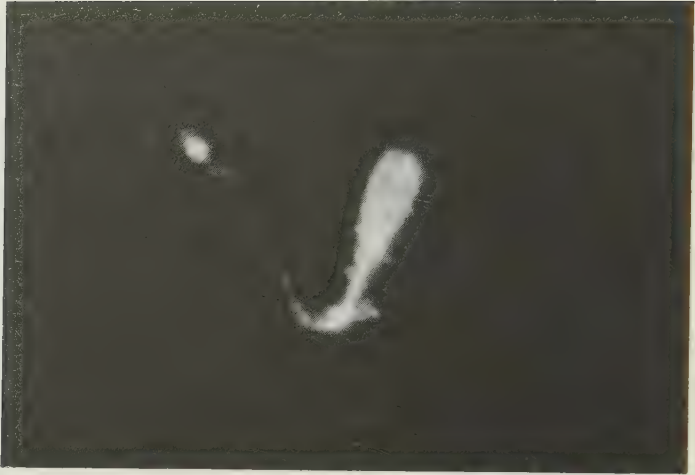


Bild 13 : Bulle, "B-body-Test", (22'), 1250 x



Bild 14 : Ziegenbock, "B-body-Test", (15'), 450 x

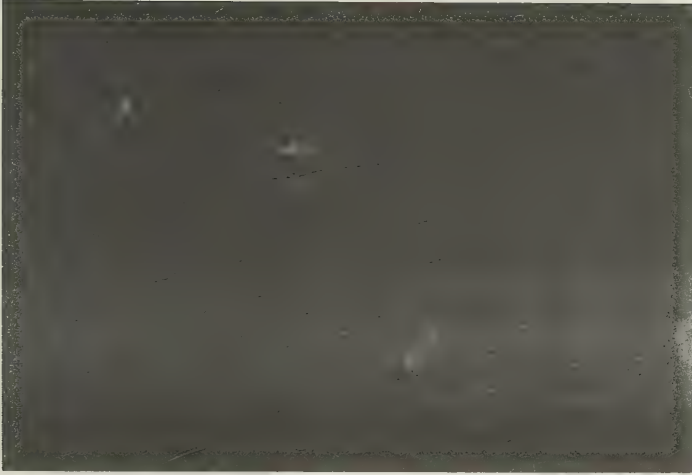


Bild 15 : Eber, "B-body-Test", (10'), 450 x



Bild 16 : Hengst, "B-body-Test", (15'), 450 x



Bild 17 : Hengst, "B-body-Test", (20'), 450 x



Bild 18 : Bulle, "B-body-Test", (15'), 450 x

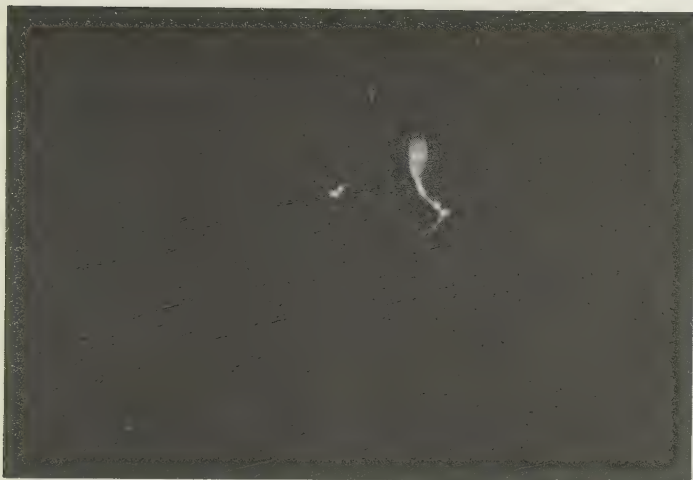


Bild 19 : Ziegenbock, "B-body-Test", (15'), 450 x



Bild 20 : Ziegenbock, "B-body-Test", PP (5') und DT (ca. 10')
behandelt, 450 x



Bild 21 : Eber, "B-body-Test", PP (5') und DT (ca. 10')
behandelt, 450 x



Bild 22 : Bulle, "B-body-Test", PP (5') und DT (ca. 10')
behandelt, 450 x

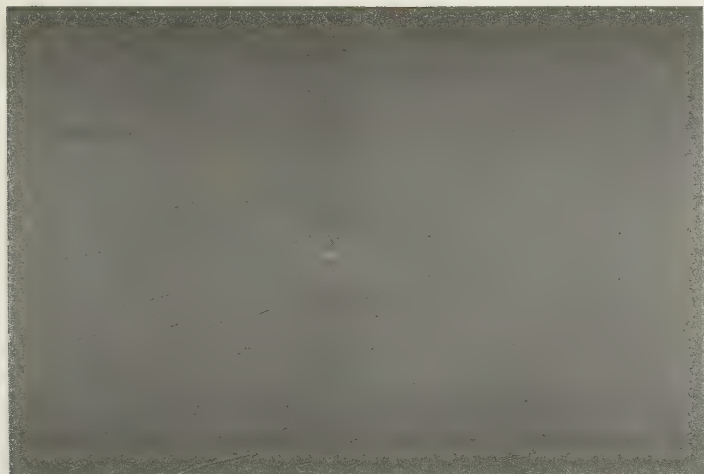


Bild 23 : Hengst, "B-body-Test", PP (5') und DT (ca. 10')
behandelt, 1000 x

9. Literaturverzeichnis

Adimoelja A., Hariadi R., Amitaba I.G., Adisetya P.,
Soeharo R. (1979)

The separation of X- and Y-Spermatozoa with regard
to the possible clinical application by means of
artificial insemination.

Andrologia 9 : 289 - 292

Anderson D.J., Bach D.L., Yunis E.J., De Wolf W.C. (1982)

Major histocompatibility antigens are not expressed
on human epididymal sperm.

J. Immunol. 129 : 452 - 461

Anisimov A.N. (1973)

Difference in sex classes of spermatozoa of the swine
ascaride, *Ascaris suum*, by DNA content and nuclear size.

Tsitologiya 15 : 1162 - 1165

Bähr H. (1965)

Mikrospektrophotometrische Untersuchungen zur Bestimmung
der Desoxyribonukleinsäure (DNS) in Samenzellen von Bullen.
Vet. med. Diss., München

Bangham A.D. (1961)

Electrophoretic characteristics of ram and rabbit
spermatozoa.

Proc. Roy. Soc. 155 : 295 - 298

Barlow P., Vosa C.G. (1970)

The Y - chromosome in human spermatozoa.

Nature 226 : 961 - 962

Beatty R.A. (1970)

The genetics of the mammalian gamete.
Biol. Rev. 45 : 73 - 119

Beatty R.A., Gluecksohn-Waelsch S. (1972)

The genetics of the spermatozoa.
Bogtrykkeriet Forum, Kopenhagen, Dänemark

Beatty R.A., Bibeau A.M. (1977)

F - bodies as Y chromosome marker in mature
human sperm heads: a quantitativ approach.
Cytogenet. Cell. Genet. 18 : 33 - 49

Beck K.J., Herschel R., Hungershöfer R.,
Schwinger E. (1976)

The effect of steroid hormones on motility
and selective migration of X - and Y - bearing
human spermatozoa.
Fertil. Steril. 27 : 407 - 412

Bedford J.M., Bibeau A.M. (1967)

Failure of sperm sedimentation to influence
the sex ratio of rabbits.
J. Reprod. Fertil. 14 : 167 - 170

Bedford J.M. (1973)

Variationes in the structural karakter and
stability of nuclear chromatin in morphologi-
cally normal human spermatozoa.
J. Reprod. Fertil. 33 : 19 - 29

Benendo F. (1970)

The problem of sex determination in the light
of own investigations.

Endokr. pol. 21 : 265 - 266

Bhattacharya B.C. (1958)

Sex control in mammals.

Z. Tierzucht. Züchtungsbio. 72 : 250 - 253

Bhattacharya B.C. (1962)

Die verschiedenen Sedimentationsgeschwindigkeiten
der X - und Y - Spermien und die Frage der willkür-
lichen Geschlechtsbeeinflussung.

Z. wiss. Zool. 166 : 203 - 210

Bhattacharya B.C. (1966)

An attempt to predetermine the sex of calves by
artificial insemination with spermatozoa separated
by sedimentation.

Nature 211 : 863 - 865

Bhattacharya B.C. (1970)

Sex-related phenotypical variation in the population
of mammalian spermatozoa.

Ind. J. Expt. Biol. 8 : 71 - 78

Bhattacharya B.C. (1974)

A universal medium for extending the useful life of
semen in vitro.

US.PAT. 3,816.249

Bhattacharya B.C., Bangham A.D., Cro R.J.,

Keynes R.D. (1976)

Pre - determination of sex in animal reproduction.

Proceedings of the VIIIth international congress on
animal reproduction and artificial insemination.

(Cracow 1976)

Bhattacharya B.C., Evans B.M. (1977)

Successful separation of X - and Y - spermatozoa in
human and bull semen.

Int. J. Fertil. 22 : 30 - 35

Bhattacharya B.C. (1977)

The counter current galvanization technique of
sex separation.

In: Guide to Pre - arranging the Sex of Offspring.

Ralston, Nebraska, Action Press: Seite 10 - 15

Bhattacharya B.C. (1979)

A convectional counterstreaming sedimentation process
for separating biological isotops.

IEEE Trans. Biomed. Eng. 26 : 160 - 164

Bhattacharya B.C., Bangham A.D., Cro R.J.,

Keynes R.D. (1981)

Semen separation technique monitored with greater
accuracy by B - body test.

Int. J. Fertil. 24 : 256 - 259

Bishop D.W. (1960)

X and Y spermatozoa.

Nature 187 : 255 - 256

Routers R. (1966)

The desoxyribonucleid acid (DNA) eximination of the ejaculate.

Proceedings of the Int. Symp. on physio. and pathol. of spermatogenesis.

Gent (1966), Seite 35 - 38

Brannen G.E. (1974)

Immunogenety of spermatozoa.

Invest. Urol. 12 : 193 - 199

Broer K.H. (1977 a)

Enrichment of X - spermatozoa and in vitro penetration through cervical mucus.

Andrologia 9 : 74 - 77

Broer K.H. (1977 b)

Isolation of Y - chromatin bearing spermatozoa and subsequent in vitro penetration tests through cervical mucus.

Int. J. Fertil. 22 : 125 - 128

Broer K.H. (1977 c)

The frequency of Y - chromatin bearing spermatozoa during in vitro penetrations tests under various experimental conditions.

Fertil. Steril. 28 : 1077 - 1081

Broer K.H., Dauber U., Kaiser R., Schuhmacher G.F.B. (1978 a)

The failure to separate human X - and Y - spermatozoa by the millipore-filtration-technique.

J. Reprod. Med. 20 : 67 - 69

Broer K.H., Dauber¹ U., Kaiser R., Schuhmacher G.F.B. (1978 b)
Versuche zur Trennung von X - und Y - Spermatozoen.
Arch. Gynaekol. 224 : 437 - 438

Brüggemann H. (1940)
Ein weiterer Beitrag zur Frage der willkürlichen
Beeinflussung des Geschlechts.
Züchtungskunde 15 : 119 - 122

Cady P., Van Vleck S. (1978)
Factors affecting twinning in Holstein diary cattle.
J. Anim. Sci. 46 : 950 - 956

Casida L.E., Murphree R.L. (1942)
Fertility and sex - ratios in the rabbit, from semen
treated in vitro with lactic acid and sodium bicarbonate.
J. Heredity 33 : 434 - 438

Caspersson T (1936)
Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zell-
kernes.
Skand. Arch. Physio. 73 (Suppl. 8) : 117 - 123

Caspersson T, Farber S., Foley G.E., Kudynowski J.,
Modest E.J., Simonsson E., Wagh U., Zech L. (1968)
Chemical differentiation along metaphase chromosomes.
Expt. Cell. Res. 49 : 219 - 223

Caspersson T, Zech L., Johannson C., Modest E.J. (1970)
Identification of human chromosomes by DNA - binding
fluorescent agents.
Chromosoma 30 : 215 - 227

Cavalieri E., Melvin C. (1971)

Molecular characteristics of some carcinogenetic hydrocarbons.

Proc. Nat. Acad. Sci. 68 : 1251 - 1254

Clark R.J., Felsenfeld G. (1971)

Structure of chromatin: Reactivity of DNA.

Nature 229 : 101 - 103

Clark R.J., Felsenfeld G. (1972)

Association of arginine-rich histones with G-C-rich regions of DNA in chromatin.

Nature 240 : 226 - 227

Cohen M.R. (1967)

Differentiation of sex as determined by ovulation timing.

Int. J. Fertil. 32 : 32 - 35

Cole L.J., Johansson I. (1933)

Sex control again.

J. Heredity 24 : 265 - 267

Cole L.J., Waletzky E., Shakelford M. (1940)

A test of sex control by modification of the acid-alkaline balance. (preliminary report)

J. Heredity 31 : 501 - 502

Comings D.E., Avelino T.A., Okada T.A., Wyandt H.E. (1973)

The mechanism of C - and G - banding of chromosomes.

Expl. Cell. Res. 77 : 469 - 493

Corneo G., Jones H.W. (1968)

Quinacrine Mustard: a fluorescent staining technique.
Biochemistry N.Y. 7 : 4373 - 4379

Daniell J.F., Herbert C.M., Repp A.M.T., Torbit C.A.,
Wentz A.C. (1982)

Initial evaluation of a convection counter-streaming
galvanization technique of sex separation of human
spermatozoa.

Fertil. Steril. 38 : 233 - 237

De La Chapelle A., Schröder J., Selander R.K., Sten-
strand K. (1973)

Differences in DNA composition along mammalian
metaphase chromosomes.

Chromosoma 42 : 365 - 382

Diasio R.B., Glass R.H. (1971)

Effects of pH on the migration of X - and Y - sperm.

Fertil. Steril. 22 : 303 - 305

Dmowski W.P. (1979 a)

Use albumin gradients for X - and Y - sperm separation
and clinical experience with male sex preselection.

Fertil. Steril. 31 : 52 - 57

Dmowski W.P. (1979 b)

Artificial insemination homologous with oligospermic
semen separated on albumin gradients.

Fertil. Steril. 31 : 58 - 62

- Downing D.C., Black D.L., Carey W.H., Delahanty D.L. (1976)
The effect of ion-exchange column chromatography on
separation of X - and Y - chromosome bearing human
spermatozoa.
Fertil. Steril. 27 : 1187 - 1190
- Drevious L.O., Ericsson H. (1966)
Osmotic swelling of mammalian spermatozoa.
Expt. Cell. Res. 42 : 136 - 139
- Eichwald E.J., Silmsen L.R. (1955)
Histocompatibility-antigens and the rejection of
tissues.
Transplantation Bulletin 2 : 148 - 153
- Ellison J.R., Barr H.J. (1972)
Quinacrine fluorescence of specific chromosome
regions.
Chromosoma 36 : 395 - 402
- Emmens C.W. (1960)
Insemination, pH and the sex-ratio in rabbits.
J. Heredity 51 : 156 - 158
- Ericsson R.J., Langevin C.N., Nishino N. (1973)
Isolation of fractions rich in human Y - sperm.
Nature 246 : 421 - 424
- Ericsson R.J. (1977)
Isolation and storage of progressively motile
human sperm.
Andrologia 9 : 111 - 113

Evans H.J. (1972)

Properties of X - and Y - sperm.

In: Edinburgh Symposium on the genetics of the
spermatozoen.

edited by R.A. Beatty S., Gluecksohn-Waelsch,
Kopenhagen, Bogtrykkeriet Forum, 1972 :

Seite 144 - 159

Evans H.J., Douglas T.A., Renton J.P. (1975)

An attempt to separate fractions rich in human
Y - sperm.

Nature 253 : 352 - 357

Flaherty L., Zimmermann D., Wachtel S.S. (1979)

H - Y - antigen: Cell surface mapping and
testosterone-induced supramolecular repatterning.

J. exp. Med. 150 : 1020 - 1027

Foote R.H. (1977)

Sex ratios in dairy cattle under various conditions.

Theriogenology 8 : 349 - 356

Friedlaender M. (1952)

Electron-microscopic investigations of the ultra-
structure of human sperms.

Proc. Roy. Soc., B, 140 : 60 - 64

Fürst C. (1886)

Knabenüberschuß nach Konzeption zur Zeit der post-
menstruellen Anämie.

Arch. Gynaek. 28 : 14 - 19

Geremia R. (1976)

Germ cell separation from mouse testis using
x - irradiation and velocity sedimentation at
unit gravity.

Boll. Zool. 43 : 139 - 149

Geremia R., D Agostino A., Monesi V. (1978)

Biochemical evidence of haploid gene activity in
spermatogenesis of the mouse.

Exp. Cell. Res. 111 : 23 - 30

Glass R.H. (1977)

Sex preselection.

Obstet. Gynecol. 49 : 122 - 124

Goldberg E.H., Boyse E.A., Bennett D., Scheid M.,
Carswell E.A. (1971)

Serological demonstration of H - Y (male) antigen
on mouse sperm.

Nature 232 : 478 - 480

Goodall H., Roberts A.M. (1976)

Differences in motility of human X - and Y - bearing
spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 48 : 433 - 436

Gordon M.J. (1957 a)

Control of sex ratio in rabbits by electrophoresis
of spermatozoa.

Proc. Nat. Acad. Sci. 43 : 913 - 916

Gordon M.J. (1957 b)

The control of sex.

Sci. Am. 199 : 87 - 94

Guerrero R. (1970)

Sex ratio : a statistical association with the type and time of insemination in the menstrual cycle.

Int. J. Fertil. 15 : 221 - 224

Hafs H.D., Boyd L.T. (1971)

Galvanic separation of X - and Y - bearing spermatozoa.

In: Sex Ratio at Birth-Prospects for Control.

edited by C.A. Kiddy and H.D. Hafs,

Albany N.Y., Boyd Printing: Seite 85 - 97

Hansen K.B. (1971)

Identification of bovine chromosomes by Quinacrine Mustard fluorescence technique.

Hereditas Genetskt. Arkiv 69 : 295 - 301

Hansen K.B. (1974)

A comparative study of various methods for the detection of spermatozoal antibodies.

Acta. Obstet. Gynec. Scand. 53 : 69 - 76

Harvey E.N. (1946)

Can the sex ratio of the mammalian offspring be controlled?

J. Heredity 37 : 71 - 74

Hedge U.C., Shastry P.R., Rao S.S. (1978)

A simple and reproductible methode for separating Y - bearing spermatozoa from human semen.

Ind. J. Med. Res. 65 : 738 - 740

Hedge U.C., Shastry P.R., Rao S.S. (1979)

Use of Dithiothreitol for improved visibility of
the F-body in human Y - bearing spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 53 : 403 - 405

Heslop B.F. (1973)

The male antigen in the rat.

Transplant. Bull. 15 : 31 - 35

Jansen M.T., Leeftang C.W. (1966)

Feulgen-DNA content of individual bull spermatozoa.

Expl. Cell. Res. 44 : 614 - 627

Jöel C.A., Kotchalsky A., Kedem O., Sternberg N. (1951)

Electrophoresis of human spermatozoa.

Experientia 7 : 274 - 280

Jones K.W. (1970)

Chromosomal and nuclear location of mouse satellite
DNA in individual cells.

Nature 225 : 912 - 915

Jones K.W., Corneo G. (1971)

Chromosomal and nuclear location of human satellite
DNA in individual cells.

Nature 228 : 341 - 344

Jones K.W., Rary J.M., Rock J.A., Cummings D. (1979)

The role of H - Y antigen in human sexual development.

The Hopkins Med. Jl. 145 : 33 - 43

Jordano D. (1952)

The calculation of the average relative difference in weight and velocity between X - and Y - bearing spermatozoa.

Arch. Zootecu. 1 : 320 - 324

Kaiser R., Citroler P., Broer K.H. (1974 a)

Relative increase in Y - chromatin bearing spermatozoa after in vitro penetration into human cervical mucus.

IRCS (Int. Res. Commun. Syst.)

Med. Sci. Libr. Compend. 2 : 1100 - 1102

Kaiser R., Broer K.H., Citroler P., Leister B. (1974 b)

Nachweis Y - Chromatin positiver Spermien im Zervixsekret beim In-vitro-Penetrationstest.

Geburtsh. u. Frauenheilkde. 34 : 426 - 430

Kaiser R., Herrmann W.P., Broer K.H. (1977)

Frequency of Y - bearing spermatozoa in relation to semenanalysis.

Andrologia 9 : 23 - 26

Kiddy C.A., Hafs H.D. (1970)

Sex ratio and birth: prospects for control.

In: Proceedings of the American Society of Animal Science, Symposium, Albany N.Y., Boyd Printing:
Seite 1 - 6

Kleegmann S. (1957)

Therapeutic donor insemination.

Fertil. Steril. 5 : 7 - 11

Koefoed-Johnsen H.H. (1960)

Influence of ejaculation on the time required for sperm formation and epididymal passage in the bull.
Nature 185 : 49 - 53

Kolk A.H.J., Samuel A., Rumke T. (1974)

Autoantigens of human spermatozoa solubilisation of a new autoantigen detected on swollen sperm heads.
Clin. Exp. Immun. 16 : 63 - 76

Koo G.C., Stackpole C.W., Boyse E.A., Hämmerling U., Lardis M.P. (1973)

Topographical localisation of H - Y - antigen on mouse spermatozoa by immunoelectronmicroscopy.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70 : 1502 - 1505

Koo G.C., Goldberg C.L. (1978)

A simplified technique for H - Y - typing.
J. Immun. Methods 23 : 197 - 201

Kordts E. (1952)

Untersuchungen über die Eignung der Elektrophorese zur Trennung von männchen- und weibchen-bestimmenden Spermien beim Kaninchen.
Ztschr. Tierzücht. Züchtungsbiol. 60 : 221 - 225

Kremer J. (1965)

A simple penetration test.
Int. J. Fertil. 10 : 29 - 32

Krupen B.K., Wachtel S.S. (1979)

Cytotoxic and agglutinating H - Y - antibodies in multiparous female mice.
Transplant. Bull. 27 : 406 - 409

Laird C.W. (1962)

Possible separation of X - and Y - bearing sperm by electrophoresis.

Proc. Nebraska Acad. Sc. 72 : 6 - 9

Laird C.W. (1963)

Observations on differences between anodic and cathodic fractions of bovine sperm separated by electrophoresis.

Proc. Nebraska Acad. Sc. 73 : 14 - 19

Laird C.W. (1964)

Dimorphism observed in bovine sperm cells and electrophoretic separation of types.

Fertil. Steril. 15 : 675 - 683

Lavon U. (1966)

The specific gravity of bull spermatozoa from different parts of the reproductiv tract.

J. Reprod. Fertil. 12 : 597 - 599

Leuchtenberger C., Schrader F., Weir D.R., Gentile D.P. (1953)

The desoxyribose nucleic acid (DNA) centent in spermatozoa of fertile and infertile human males.

Chromosoma 6 : 61 - 67

Leuchtenberger C., Weir D.R., Schrader F., Murmanis P., Murmanis L. (1955)

The desosyribose nucleic acid (DNA) content in spermatozoa of repeated seminal fluids from fertile and infertile men.

J. Lab. and Clin. Med. 45 : 851 - 855

Leuchtenberger C., Murmanis I., Murmanis L., Susumi, I.,
Weir D.R. (1956)

Interferometric dry mass and microspectrophometric
arginine determination on bull sperm nuclei with
normal and abnormal DNA content.

Chromosoma 9 : 73 - 83

Leuchtenberger C., Leuchtenberger R. (1958 a)

Decreased amounts of desoxyribonucleic acid (DNA)
in male germ cells as a possible cause of human male
infertility.

Acta genet. 6 : 272 - 274

Leuchtenberger C., Leuchtenberger R. (1958 b)

Differences in desoxynucleoprotein content of human
and cattle spermatozoa.

In: Nuclear Sex : Seite 31 - 41.

edited by D.R. Smith, Interscience Pub.,
New York

Lewin S. (1956)

Artificial sex-regulation of mammalian offsprings.

Brit. Vet. J. 112 : 549 - 552

Lindhahl P.E., Kihlstrom J.E. (1952)

Alteration in specific gravity during the ripening
of bull spermatozoa.

J. Dairy. Sci. 35 : 393 - 399

Lindhahl P.E. (1956)

Counter-streaming centrifugation of bull spermatozoa.

Nature 178 : 491 - 493

Lindahl P.E. (1958)

Separation of bull spermatozoa carrying X - and
Y - chromosomes by counter-streaming centrifugation.
Nature 181 : 784 - 787

Lopo A.C., Vacquier V.D. (1980)

Sperm specific surface antigenity common to seven
animal phyla.
Nature 288 : 397 - 399

Luderer A.A., Zine A.R., Hess D.M., Henyan J.,
Odstrechel G. (1979)

Rapid, quantitativ human lymphocyte separation and
purification in a closed system.
Mol. Immunol. 16 : 621 - 624

Luderer A.A., Dean W.W., Zine A.R., Hess D.M.,
Foote R.H., Wall R.J. (1982)

Separation of bovine spermatozoa by density on water
insoluble Newtonian gels and their use for insemination.
Bio. Reprod. 26 : 813 - 824

Machowka W.W., Schegaloff S.B. (1935)

Die Reaktion von Spermatozoen auf konstanten Strom
(Galvanotaxis).
Arch. f. Entw. Mech. der Organ. 133 : 694 - 696

Mc Arthur C.P., Sengupta S. (1981)

The H - Y - Antigen: A methode for the detection
of antibodies in rat semen.
J. Immunoassay 2 : 163 - 174

Michelson A.M., Monny C., Kovoov A. (1972)

Action of quinacrine mustard on polynucleotides.
Biochimie 54 : 1129 - 1136

Milette C.F., Bellve A.R. (1977)

Temporal expression of membran antigens during
mouse spermatogenesis.

J. Cell. Biol. 74 : 86 - 97

Milette C.F. (1979)

Cell surface antigens during mammalian spermatogenesis.

In: Current Topics in Developmental Biology

(Vol 13): Seite 22 - 28.

edited by A.A. Moscona and A. Monroy, Academic
Press, New York

Monesi V. (1971)

Chromosome activities during meiosis and
spermiogenesis.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 13 : 1 - 14

Monesi V. (1977)

Chromosome activities during mammalian spermatogenesis.

In: Current Topics in Developmental Biology

(Vol 12): Seite 41 - 47.

edited by A.A. Moscona and A. Monroy, Academic
Press, New York

Moruzzi J.F. (1980)

Selecting a mammalian species for the separation
of X - and Y - chromosome bearing spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 57 : 319 - 323

Moses M.J., Slatton G.H., Gambling T.M., Starmer
C.F. (1977 a)

Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes
of the Chinese hamster:

I Morphology of the autosomal complement in spread
preparations.

Chromosoma 60 : 99 - 125

Moses M.J., Slatton G.H., Gambling T.M., Starmer
C.F. (1977 b)

Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes
of the Chinese hamster:

II Morphology of the XY-pair in spread spermatocytes.

Chromosoma 60 : 127 - 137

Moses M.J., Slatton G.H., Gambling T.M. Starmer
C.F. (1977 c)

Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes
of the Chinese hamster:

III Quantitative evaluation.

Chromosoma 60 : 345 - 375

Mudd S., Mudd P. (1929)

The specificity of mammalian spermatozoa, with
especial reference to electrophoresis as a means
of serological differentiation.

J. Immunol. 17 : 39 - 52

und

Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 26 : 392 - 403

Müller U., Aschmoneit I., Zenzen M.T., Wolf U. (1978 a)

Binding studies of H - Y - antigen in rat tissues.
Indication for a gonad-specific receptor.

Hum. Genet. 43 : 151 - 157

Müller U., Siebers J.W., Zenzes M.T., Wolf U. (1978 b)
The testis as a secretory organ for H - Y - antigen.
Hum. Genet. 45 : 209 - 213

Müller U., Wolf U., Siebers J.W., Günther E. (1979)
Evidence for a gonad-specific receptor for H - Y -
antigen. Binding of exogenous H - Y - antigen to
gonadal cells is independent of β -microglobulin.
Cell. 17 : 331 - 335

Müller U. (1980)
Testis determining H - Y - antigen and the induction
of the HCG receptor.
In: Chorionic Gonadotropin.
Plenum Press, New York, Seite 371 - 382

Müller U. (1981)
H - Y - antigen and antigens of the major histo-
compatibility complex:
H - Y - and H - 2D - antigens are associated on
unfixed lymphocytes and thymocytes, but not on
testicular cells.
Tissue Antigens 18 : 40 - 50

Nagai Y., Ciccarese S., Ohno S. (1979)
The Identification of human X - Y - antigen and
testicular transformation.
Induced by its interaction with the receptor
site of bovine fetal ovarian cells.
Diff. 13 : 155 - 164

Nevo A.C., Michaeli I., Schindler H. (1961)
Electrophoretic properties of bull and rabbit
spermatozoa.
Exp. Cell. Res. 23 : 69 - 83

Noerby S. (1980)

H - Y - antigen: a hazard to the female?

Med. Hypotheses 6 : 1113 - 1116

Oettlé A.G. (1950 a)

Microscopy of sperms. (I)

J. Roy. Micro. Soc. 70 : 232 - 245

Oettlé A.G. (1950 b)

Microscopy of sperms. (II)

J. Roy. Micro. Soc. 70 : 255 - 268

Ohno S., Wachtel S.S. (1978)

On the selective elimination of Y bearing sperms.

Immunogenetics 7 : 13 - 16

Ohno S. (1979)

Major sex-determining genes.

Springer Verlag (Berlin, Heidelberg, New York)

Pachmann U., Rigler R. (1972)

Quinacrine fluorescent dyes and their action on polynucleotides.

Expl. Cell. Res. 72 : 602 - 605

Pardue M.L., Gall J.G. (1970)

Chromosomal localisation of mouse satellite DNA.

Science 168 : 1356 - 1358

Pearson P.L., Bobrow M., Vosa C.G. (1970 a)

Fluorescent staining of the Y - chromosome in meiotic stages of the human male.

J. Reprod. Fertil. 22 : 177 - 179

Pearson P.L., Bobrow M., Vosa C.G. (1970 b)

Technique for identifying Y - chromosomes in
human interphase nuclei.

Nature 266 : 78 - 81

Pearson P.L., Bobrow M., Vosa C.G., Barlow P.W. (1971)

Quinacrine mustard fluorescence in mammalian
chromosomes.

Nature 231 : 326 - 329

Pearson P.L. (1972)

The use of new staining techniques for human
chromosome identification.

J. Med. Genet. 9 : 264 - 267

Pilz A. (1952)

Das Verhalten der Säugetierspermien im elektrischen
Feld.

Ztschr. f. Tierzücht. Züchtungsbiol. 60 : 315 - 319

Porstmann T. (1976)

Die Differenzierung von Humanspermien in Andro- und
Gynospemien durch Quinacrinfärbung.

Morphologie und funktionelle Untersuchungen an beiden
Spermienpopulationen und Versuche zu ihrer Trennung im
Hinblick auf eine willkürliche Geschlechtsregulation.

Med. Diss., Berlin

Porstmann T., Rohde W., Prehn S., Schmechta H.,

Porstmann B., Engel S., Dörner G. (1978)

Partielle Trennung von menschlichen Gyno- und Andro-
spermien mittels Sephadexchromatographie, Dichte-
gradientenzentrifugation in Saccharose und Dextran
sowie progressive Motilität im Zervixsekret.

Dermatol. Monatsschr. 164 : 550 - 556

Porstmann T., Schmechta H. (1979)

Säulenchromatographische Trennung von humanen
X - und Y - Spermien.

Dermatol. Monatsschr. 165 : 28 - 35

Pryll W. (1916)

Kohabitationstermin und Kindgeschlecht.

Münch. med. Wschr. 63 : 1579 - 1584

Quinlivan W.L.G., Sullivan H., Leslie W. (1975)

The ratios and separation of X - and Y - spermatozoa
in human semen.

Fertil. Steril. 25 : 315 - 318

Quinlivan W.L.G., Preciado K., Long T.C.,

Sullivan H. (1982)

Separation of human X - and Y - spermatozoa by
albumin gradients and Sephadex chromatography.

Fertil. Steril. 37 : 104 - 107

Quisenberry H.J., Chandiramani S.V. (1940)

An experimental attempt to modify the sex ratio
in rats and rabbits.

J. Heredity 31 : 503 - 507

Quisenberry H.J., Chandiramani S.V. (1945)

Additional data on sex control in rabbits.

J. Heredity 36 : 160 - 164

Roberts E. (1940)

The effect of lactic acid and sodium bicarbonate
on the sex ratio.

J. Heredity 31 : 499 - 505

Roberts A.M. (1970)

Geotaxis in motile microorganism.

J. Expt. Biol. 53 : 687 - 692

Roberts A.M. (1972)

Gravitational separation of X - and Y - spermatozoa.

Nature 238 : 223 - 225

Roberts A.M., Goodall H. (1976)

Y - chromosome visibility in quinacrine-stained
human spermatozoa.

Nature 262 : 493 - 494

Rohde W., Porstmann T., Zillmann R., Dörner E. (1972)

Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des Y - Chromosoms in unbehandelten und tryptinbehandelten menschlichen Spermien.

Acta. biol. et med. germ. 28 : 189 - 192

Rohde W., Dörner G., Porstmann T. (1973)

Migration of Y - bearing human spermatozoa in cervical mucus.

J. Reprod. Fertil. 33 : 167 - 169

Rohde W., Porstmann T., Dörner G., Prehn S. (1975 a)

Gravitational pattern of the Y - bearing human spermatozoa in density gradient centrifugation.

J. Reprod. Fertil. 42 : 587 - 591

Rohde W., Porstmann T., Prehn S., Dörner G. (1975 b)

Zur Frage der partiellen Trennung von X - und Y - tragenden Spermien beim Menschen.

Zbl. Gynäkol. 97 : 408 - 412

Ross A. (1975)

Failure to confirm separation of X - and Y - bearing
human sperm using BSA-gradients.

Nature 253 : 354 - 359

Rothschild Lord (1960)

X - and Y - spermatozoa.

Nature 187 : 253 - 254

Sandritter W. (1958)

Ultraviolett-mikrospektrophotometrie

In: Handbuch der Histochemie Bd. I,1

Herausgeber: W. Graumann und K. Neumann,
Fischer-Verlag, Stuttgart

Sandritter W., Grosser K.D. (1964)

Quantitative, histochemische Untersuchungen
an Spermien.

Symp. Biol. Hung. 4 : 63 - 69

Schäper W. (1937)

Beitrag zur willkürlichen Beeinflussung des
Geschlechts.

Züchtungskunde 12 : 232 - 236

Schilling E. (1966)

Zur Frage der willkürlichen Beeinflussung
des Geschlechts bei Säugetieren.

Zuchthygiene 1 : 5 - 13

Schilling E. (1967)

Größe und Geschwindigkeit der Samenzellen von Rind und Schaf und deren mögliche Beziehungen zum Geschlecht.

Z. Tierzücht. Züchtungsbiol. 83 : 331 - 337

Schilling E., Thormählen D. (1975)

Versuche zur Trennung von X - und Y - Spermien aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit.

Zuchthygiene 10 : 188 - 190

Schilling E., Thormählen D. (1977)

Enrichment of human X and Y spermatozoa by density gradient centrifugation.

Andrologia 9 : 106 - 109

Schilling E., Lafrenz R., Klobasa F. (1978)

Failure to separate human X - and Y - chromosome bearing spermatozoa by Sephadex-gel-filtration.

Andrologia 10 : 215 - 217

Schröder V. (1941)

Künstliche Geschlechtsregulation der Nachkommenschaft der Säugetiere und ihre biologische Kontrolle.

Z. Tierzücht. Züchtungsbiol. 50 : 1 - 8

Schultz P., Larson J. (1958)

The morphology of the human sperm: electron-microscopic investigations of the ultrastructure.

Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl. 128 : 121 Seiten

Selander R.K. (1973 a)

Quinacrine mustard and the fluorescence with
nucleic acids (I)

Biochem. J. 131 : 749 - 757

Selander R.K. (1973 b)

Quinacrine mustard and the fluorescence with
nucleic acids (II)

Biochem. J. 131 : 757 - 766

Selander R.K. (1973 c)

The fluorescence of quinacrine mustard with
nucleic acids.

Nature 245 : 240 - 244

Sevinç A. (1968)

Experiments on sex control by electrophoretic
separation of spermatozoa in the rabbit.

J. Reprod. Fertil. 16: 7 - 14

Silvers W.K., Wachtel S.S. (1977)

H - Y - Antigen: behaviour and function.

Science 195 : 956 - 962

Silvers W.K., Wachtel S.S., Benirschke K., Murphy G.,
Poole T.W. (1978)

Studies on the H - Y - antigen in rat.

Immunogenetics 4 : 85 - 100

Sharp A.J., Wachtel S.S., Benirschke K. (1980)

H - Y - antigen in a fertil XY female horse.

J. Reprod. Fertil. 58 : 157 - 160

Shettles L.B. (1960 a)

Nuclear structure of human spermatozoa.

Nature 186 : 648 - 649

Shettles L.B. (1960 b)

X - and Y - spermatozoa.

Nature 187 : 254 - 255

und

Nature 188 : 918 - 923

Shettles L.B. (1961 a)

Human spermatozoa types.

Gynaecologia 152 : 154 - 159

Shettles L.B. (1961 b)

Conception and birth sex ratios.

Obstet. Gynec. 18 : 122 - 123

Shettles L.B. (1961 c)

Difference in human spermatozoa.

Fertil. Steril. 12 : 20 - 23

Shettles L.B. (1962)

Human spermatozoan populations.

Int. J. Fertil. 7 : 75 - 78

Shettles L.B. (1970)

Factors influencing sex ratios.

Int. J. Gynaec. Obstr. 8 : 643 - 647

Shettles L.B. (1976)

Separation of X - and Y - spermatozoa.

J. Urol. 116 : 462 - 465

Shishito S., Shirai M., Matsuda S. (1974)

Galvanic separation of X - and Y - bearing human spermatozoa.

Int. J. Fertil. 20 : 13 - 16

Shishito S., Shirai M., Sasaki K. (1975)

Galvanic separation of X - and Y - bearing human spermatozoa.

Andrologia 6 : 17 - 24

Siegel P.W. (1916)

Bedeutung des Kohabitationstermins für die Befruchtungsfähigkeit der Frau und für die Geschlechtsbildung des Kindes.

Münch. med. Wschr. 63 : 748 - 753

Solari A.J., Ashley T. (1977)

Ultrastructure and behaviour of the achiasmatic telosynaptic XY-pair of the sand rat.

Chromosoma 62 : 319 - 336

Stambaugh R., Buckley J. (1970)

Relationship of the X - and Y - chromosomes to enzyme variation in fractionated spermatozoa.

In: Sex ratio at birth-prospects for control.

edited by Kiddy C.A., Hafs H.D.,

Champaign, Ill.: American Society of Animal Science

Stambaugh R., Buckley J. (1971)

Association of lactic dehydrogenase X isoenzyme with male-producing spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 25 : 275 - 278

Stedman E., Olds E. (1961)

Levels of desoxyribonucleic acid in bovine
spermatozoa and their relationship to fertility.
Biochem. J. 47 : 508 - 512

Steeno O., Adimoelja A., Steeno J. (1975)

Separation of X - and Y - bearing human spermatozoa
with the Sephadex gelfiltration method.
Andrologia 7 : 95 - 97

Stolla R. (1968)

Ultraviolettmikrospektrophotometrische Unter-
suchungen an Samenzellen unter besonderer Be-
rücksichtigung des DNS-Gehaltes der X - und
Y - Spermien.
Vet. Diss., München

Sumner A.T., Robinson J.A., Evans H.J. (1971)

Distinguishing between X-, Y-, YY-bearing
spermatozoa by fluorescence and DNA content.
Nature 229 : 231 - 233

Sumner A.T., Robinson J.A., Evans H.J. (1976)

A difference in dry mass in the head of X -
and Y - bearing spermatozoa.
J. Reprod. Fertil. 48 : 9 - 15

Swift H. (1950)

The desoxyribose nucleic acid content of animal
nuclei.
Physio. Zool. 23 : 169 - 173

Tung K.S.K. (1975)

Human sperm antigens and antisperm antibodies.
Studies on vasectomy patients.
Clin. Exp. Immun. 20 : 93 - 104

Tung S.P., Gore-Langton R.E., Irving P.F. (1982)

An objective sperm cytotoxicity assay for male -
specific antisera based on ATP levels of unlysed
cells: Application to assay of H-Y-antigen.
J. Reprod. Immunol. 4 : 233 - 239

Thormählen D. (1973)

Dichtegradientenzentrifugation von Samenzellen
und Beeinflussung des Geschlechts von Nachkommen
des Kaninchens.
Vet. med. Diss., Hannover

Unterberger F. (1930)

Das Problem der willkürlichen Beeinflussung des
Geschlechts beim Menschen.
Dtsch. med. Wschr. 56 : 304 - 309

Unterberger F., Kirsch W. (1932)

Bericht über Versuche zur Beeinflussung des
Geschlechtsverhältnisses beim Kaninchen nach
Unterberger. I. Mitteilung

Van Duijn C. (1960)

Nuclear structure of human spermatozoa.
Nature 188 : 916 - 918

Van Duijn C. (1961)

Size frequency distribution in spermatozoa.
Fertil. Steril. 12 : 509 - 515

Vesselinovitch S.D. (1959 a)

Microelectrophoresis of bovine spermatozoa (I).

Canad. J. Compar. Med. and Vet. Sci. 23 : 2 - 6

Vesselinovitch S.D. (1959 b)

Microelectrophoresis of bovine spermatozoa (II).

Canad. J. Compar. Med. and Vet. Sci. 23 : 7 - 11

Vesselinovitch S.D. (1959 c)

Microelectrophoresis of bovine spermatozoa (III).

Cornell Vet. 49 : 359 - 361

Wachtel S.S., Koo G.C., Zuckerman E.E., Hämmerling U.,

Scheid M.P., Boyse E.A. (1974)

Serological crossreactivity between H-Y (male)
antigens of mouse and man.

Proceedings of the National Academy of

Science (USA) 71 : 1215 - 1217

Wachtel S.S., Ohno S., Koo G.C., Boyse E.A. (1975 a)

Possible role for H-Y antigen in the primary
determination of sex.

Nature 257 : 235 - 239

Wachtel S.S., Koo F.C., Boyse E.A. (1975 b)

Evolutionary conservation of H-Y (male) antigen.

Nature 254 : 270 - 272

Wachtel S.S. (1977)

H-Y-Antigen: genetics and serology.

Immunol. Rev. 33 : 33 - 42

Walker P.M.B., Yates H.B. (1952)

Ultra-violet absorption of living cell nuclei
during growth and division.

Symposia Soc. Expt. Biol. 6 : 265 - 268

Walker P.B.M., Richards R.M. (1957)

A methode for investigation of the stoichiometry
of Feulgen stain.

Expt. Cell. Res. Suppl. 4 : 97 - 102

Weir J.A. (1955)

Male influence on sex ratio of offspring in high
and low blood pH.

Lines of mice.

J. Heredity 46 : 277 - 281

Weir D.R. (1957)

Low sperm desoxyribose nucleic acid as a possible
cause for otherwise unexplained human infertility.

Fertil. Steril. 8 : 373 - 377

Weisblum B., De Haseth P.I. (1972)

Fluorescent staining technique with quinacrine
mustard.

Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 69 : 629 - 634

Wolf U., Fraccaro M., Mayerova A., Hecht T.,

Marashino P., Hameister H. (1980)

A gene controlling H-Y antigen on the
X - chromosomes.

Human. Genetics 54 : 149 - 153

Zech L. (1969)

Investigations of metaphase chromosomes with
DNA-binding fluorochromes.

Exp. Cell. Res. 38 : 463 - 465

Ziparo E., Geremia R., Russo M.A. (1980)

Surface interaction in vitro between Sertoli cells
and germ cells at different stages of spermatogenesis.

Am. J. Anat. 159 : 385 - 388

10. Lebenslauf

Name	Junginger
Vorname	Bernd
Geb.-Datum	13.03.1958
Geb.-Ort	7824 Steinheim am Albuch Kreis Heidenheim
Konfession	evangelisch
Eltern	Junginger Erwin, Dipl. Verwaltungswirt (FH), Bürgermeister und Junginger Hedwig, geb. Mannbeiß 7312 Kirchheim unter Teck, Kreis Esslingen
Schulbildung	Grundschule 7311 Jesingen, Kreis Esslingen, von 1965 bis 1968. Schloßgymnasium 7312 Kirchheim unter Teck von 1968 bis 1970. Ludwig-Uhlandgymnasium 7312 Kirchheim unter Teck' von 1971 bis 1978 mit dem Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife und dem Erwerb des Großen Latinums am 11.05.1978.
Bundeswehr	Wehrpflichtdienst vom 01.07.1978 bis 30.09.1979.
Studium	Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München ab dem WS 1979/80 bis zum WS 1984/85. Bestehen des Staatsexamens am 29.01.1985. Anerkennung der Approbation am 06.03.1985 durch das Bayer. Staatsministerium des Innern.

Frau Professor Dr. I. Rüsse möchte ich für die Überlassung des Themas und für das Interesse, welches sie dieser Arbeit entgegengebracht hat, sehr herzlich danken.

Ebenso gilt mein Dank Frau Nehmati und allen, die durch ihre entgegenkommende Mithilfe sehr zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

